

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 166

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'UROCHROME

THÈSE
POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 27 Novembre 1931

PAR

Yvonne KOPP

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Moniteur de Chimie biologique à la Faculté

née le 24 Mai 1903, à Lons-le-Saunier (Jura)



LYON ET VILLEURBANNE
ASSOCIATION TYPOGRAPHIQUE
P. PINTAPARIS, Directeur

1931

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'UROCHROME

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE — N° 166

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'UROCHROME

THÈSE
POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
(SECTION DE PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 27 Novembre 1931

PAR

Yvonne KOPP

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon

Moniteur de Chimie biologique à la Faculté

née le 24 Mai 1903, à Lons-le-Saunier (Jura).



LYON ET VILLEURBANNE
ASSOCIATION TYPOGRAPHIQUE
P. PINTAPARIS, Directeur

1931

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire M. L. HUGOUNENO
Doyen M. J. LEPINE.
Assesseur..... M. ROLLET.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENO,
ROCHET, BARRAL.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	}	MM. PIC.
Cliniques chirurgicales		PAVIOT.
Clinique obstétricale et Accouchements.....		TIXIER.
Clinique ophtalmologique		BERARD.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....		VORON.
Clinique neurologique et psychiatrique.....		ROLLET.
Clinique des maladies des enfants.....		NICOLAS.
Clinique des maladies des femmes.....		LEPINE (J.).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		MOURIQUAND.
Clinique des maladies des voies urinaires.....		VILLARD.
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie.....		COLLET.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie...		GAYET.
Clinique et Prophylaxie de la tuberculose.....		NOVE-JOSSERAND.
Chimie biologique et médicale.....		CLUZET.
Chimie organique et Toxicologie.....		COURMONT.
Matière médicale et Botanique.....		FLORENCE.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....		MOREL.
Anatomie		MANCEAU.
Histologie		GUIART.
Physiologie		LATARJET.
Pathologie externe		POLICARD.
Pathologie interne		DOYON.
Pathologie et Thérapeutiques générales.....		LERICHE.
Anatomie pathologique		FROMENT.
Chirurgie opératoire		CADE.
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie.		FAVRE.
Médecine légale		PATEL.
Hygiène		ARLOING (F.).
Thérapeutique		ETIENNE MARTIN.
Pharmacie		X...
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....		SAVY.
		LEULIER
		PIERY.

PROFESSEUR TITULAIRE SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie.. M. CONDAMIN.

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

Anatomie topographique	MM. THÉVENOT (Léon).
Puériculture et hygiène de la première enfance.....	
Chirurgie expérimentale	
Applications du radium.. ..	
Stomatologie	RHENTER.
	TAVERNIER.
	NOGIER.
	TELLIER.

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER.	CHALIER (Joseph).	MARTIN (Joseph)	CHAMBON.
ROCHAIX.	NOEL.	ROCHET (Ph.).	CIBERT.
RHENTER.	DUMAS.	WERTHEIMER.	EPARVIER.
MAZEL.	DUFOURT.	GATE.	GUILLEMINET.
SANTY.	DEVIC.	BERNHEIM.	MORENAS.
CHALIER (André)	GABRIELLE.	DECHAUME.	REBATTU
		POLLOSSON.	

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. G. FLORENCE, Président. — E. BARRAL, Assesseur.
M. SAVY, Professeur. — M. CHAMBON, Agrégé.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE,

En témoignage de pieux souvenir.

A MA MÈRE.

A MA SŒUR.

A TOUS LES MIENS.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. FLORENCE,
Professeur de Chimie Biologique et Médicale,
Chevalier de la Légion d'honneur.

A MES JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. BARRAL,
Professeur Honoraire de Chimie Minérale,
Chevalier de la Légion d'honneur.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. SAVY,
Professeur de Thérapeutique,
Médecin des Hôpitaux,
Chevalier de la Légion d'honneur.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. CHAMBON,
Pharmacien en Chef de l'Hôtel-Dieu.

A MES MAÎTRES
*de la Faculté de Médecine et de Pharmacie,
et des Hôpitaux de Lyon.*

A MONSIEUR E. FAYÏSSE,
Pharmacien,
Mon Maître de Stage.

A MES CAMARADES D'INTERNAT.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

C'est nous acquitter d'un devoir agréable que de remercier vivement les Maîtres de cette Faculté qui nous ont formé au cours de nos études.

Que notre Président de thèse, M. le Professeur FLORENCE, trouve ici l'assurance de notre sincère reconnaissance pour l'accueil bienveillant que nous avons reçu dans son laboratoire où il nous a fait l'honneur de nous admettre comme moniteur de chimie biologique.

En nous donnant ce travail, en acceptant de présider notre jury de thèse, il nous donne de nouvelles preuves de sa bienveillance. Qu'il trouve ici un faible témoignage de notre reconnaissance.

M. le Professeur BARRAL nous a fait le grand honneur de nous admettre dans son laboratoire. Durant plus de trois années, ce Maître a bien voulu s'intéresser à nous, avec une bienveillance toute particulière et nous guider de ses précieux conseils. Il restera pour nous l'exemple inoubliable d'un labeur scientifique de tous les instants et d'une activité intellectuelle sans limite. Qu'il permette à l'un de ses élèves particulièrement heureux d'avoir pu travailler à ses côtés, d'exprimer ici sa profonde reconnaissance et sa respectueuse gratitude.

Nous sommes très sensible à la marque d'estime que M. le Professeur SAVY veut bien nous donner en acceptant de faire partie de notre jury de thèse. Pendant les deux semestres que nous venons de passer dans son service à l'Hôtel-Dieu, comme interne en pharmacie, nous avons trouvé auprès de lui un accueil plein de sympathie et de bienveillance. Sa grande bonté pour les malades, son enseignement clinique si précis, resteront fidèlement gravés dans notre mémoire. Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre sincère et respectueuse reconnaissance.

M. le Professeur agrégé CHAMBON, pharmacien chef de l'Hôtel-Dieu, dont nous avons été l'interne en pharmacie pendant deux ans, nous a toujours témoigné la plus cordiale sympathie. Il n'a cessé d'être pour nous un conseiller avisé et nous l'avons toujours trouvé prêt à nous aider de sa grande compétence. Il nous donne aujourd'hui une nouvelle preuve de son inlassable bienveillance en nous faisant l'honneur d'accepter d'être un de nos juges. Qu'il veuille bien trouver ici nos respectueux remerciements.

Nos remerciements vont ensuite à M. le Dr ENSELME, docteur ès-sciences, chef de travaux à la Faculté. Pendant l'année que nous avons passé au laboratoire comme moniteur, nous avons trouvé auprès de lui un accueil plein de sympathie et une sollicitude toujours agissante. Il a bien voulu s'intéresser à nos recherches qu'il a facilitées de son mieux. Qu'il veuille bien recevoir ici la marque de notre vive gratitude.

Nous devons aussi beaucoup à M. le Docteur COUTURE, docteur ès-sciences, préparateur à la Faculté. Il ne nous

ni ménagé ni son temps, ni ses conseils. L'empressement qu'il a apporté à nous aider dans nos analyses chimiques nous a donné une preuve, et de sa haute valeur scientifique, et de son inaltérable amabilité. Qu'il trouve ici un bien faible témoignage de notre profonde reconnaissance.

A tous ceux enfin qui nous ont aidé de leurs conseils et de leurs encouragements, nous adressons un sincère merci.

INTRODUCTION

L'organisme animal comporte un grand nombre de matières colorantes complexes qui donnent aux tissus et liquides de l'organisme des teintes caractéristiques.

On donne le nom de pigment (en vertu de l'étymologie même de ce mot « *pigmentum* » voulant dire couleur) à ces substances colorantes, sortes de principes immédiats de l'organisme.

Parmi les liquides colorés de l'économie, sang, bile, urine, c'est ce liquide qui, par sa variation de couleur, donne aux biologistes un sujet d'étude de tout premier ordre.

En effet, la couleur de l'urine est un signe important qui peut fournir d'excellentes indications pour porter un jugement sur un état pathologique, et l'étude du colorant urinaire normal est une partie de la chimie biologique vers laquelle beaucoup de chimistes se sont orientés.

N'est-ce pas un problème biochimique de grand intérêt que de chercher à connaître, d'une part la genèse, d'autre part la constitution de ces colorants fournis par l'organisme animal ?

La multiplicité des travaux à ce sujet, montre l'importance de ce sujet et nous avons pensé qu'il ne serait pas inutile d'apporter une faible contribution à cette étude.

L'urine étant un liquide coloré, il est d'un grand intérêt de connaître le produit générateur de cette couleur et d'essayer, en l'extrayant de l'urine, d'en faire un corps chimique défini.

Nous avons, étant donné le nombre considérable de

recherches sur les pigments urinaires, essayé de résumer l'état actuel de cette question dans une étude historique d'une part et une classification des nombreuses méthodes d'obtention des matières colorées de l'urine d'autre part.

Nous avons étudié la méthode de A. FLORENCE [27], que nous avons personnellement appliquée non sur une urine hémaphéique comme le faisait cet auteur, mais sur une urine normale comme nous l'indiquons dans notre premier chapitre sur les colorants urinaires normaux.

Nous avons résumé les caractères physiques, chimiques, spectroscopiques, du produit obtenu dans notre méthode, en essayant de relier nos recherches et nos résultats avec ceux obtenus par les auteurs précédents.

Nous avons fait une étude chimique de notre produit d'extraction, une analyse élémentaire afin de comparer nos résultats avec ceux obtenus dans les études antérieures faites sur le pigment urinaire normal.

Il nous a semblé intéressant d'essayer de rattacher la matière colorante de l'urine à un groupe chimique défini afin d'expliquer et son origine et sa genèse. Nous nous sommes pour cela adressé aux travaux actuels faits à ce sujet et les réactions que nous a données notre produit nous ont permis de nous rallier à cette conception moderne de la genèse des pigments urinaires normaux.

La similitude des propriétés physiques, chimiques, spectroscopiques, les réactions analytiques communes entre le produit obtenu par la méthode de FLORENCE et l'*urochrome* des auteurs, nous ont paru suffisantes pour démontrer que cette méthode est un procédé d'extraction de l'*urochrome* et que notre substance extractive est de l'*urochrome*.

PLAN SUIVI DANS CE TRAVAIL

CHAPITRE PREMIER. — *Etude théorique des pigments urinaires.*

- A. — La couleur de l'urine.
- B. — Historique.
- C. — Méthodes d'extractions.

CHAPITRE II. — *Recherches personnelles sur le pigment obtenu par la méthode de A. FLORENCE.*

- A. — Méthode de A. FLORENCE.
- B. — Caractères physiques. Réactions analytiques.
- C. — Caractères spectraux.

CHAPITRE III. — *Composition chimique de la matière extractive de A. FLORENCE.*

- A. — Propriétés chimiques.
- B. — Analyse élémentaire.

CHAPITRE IV. — *Théorie sur la constitution probable du pigment normal.*

- A. — C'est un corps voisin des acides protéiques.
- B. — Il donne la réaction d'Ehrlich.
- C. — Il donne par distillation du pyrrol.
- D. — Il donne une mélanine.

CHAPITRE V. — *Conclusion.*

- A. — Similitude du pigment de FLORENCE avec l'urochrome.
- B. — Variations quantitatives de l'urochrome.
- C. — Origine probable.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE THÉORIQUE DES PIGMENTS URINAIRES

A. — LA COULEUR DE L'URINE

L'urine de l'homme est à l'état normal un liquide coloré, ambré, possédant la teinte jaune paille de l'ambre ou du succin, mais si on observe cette coloration, on la voit varier du jaune pâle au jaune brunâtre suivant les heures de la journée, l'alimentation, l'administration de certains médicaments.

Si l'on s'adresse à un malade, la variation de la couleur est beaucoup plus sensible, l'urine peut passer par toutes les gammes de tonalité du jaune rouge au noir.

Toutes ces causes de transformation de l'aspect de l'urine compliquent l'étude des pigments urinaires, aussi est-il utile au début de ce travail de considérer d'une part *les pigments normaux ; les pigments pathologiques et les pigments médicamenteux* d'autre part.

L'étude rapide de la couleur des urines et de sa variation permettra ainsi de montrer à quel groupe de pigments nous nous sommes adressé pour en faire l'étude.

Les pigments normaux de l'urine donnent à ce liquide sa teinte jaune caractéristique qui peut être jaune paille, jaune d'or, rougeâtre. VOGEL [79] a établi un tableau des gammes de couleurs qu'affecte l'urine.

Mais la coloration est en rapport avec un grand nombre de facteurs et la quantité de matière colorante éliminée par jour varie avec diverses causes que nous allons essayer de résumer.

La couleur de l'urine varie avec sa *dilution*, en effet l'urine de la nuit est plus foncée que celle du jour.

Après un repas, elle subit *l'action de l'alimentation*, elle est abondante et peu colorée.

A la suite d'ingestion de boissons alcooliques et plus ou moins diurétiques, elle contient peu de matière colorante par contre elle est abondante comme dans certains cas pathologiques de polyurie ; après un repas copieux elle fonce.

La couleur de l'urine change avec *l'âge* ; l'urine de l'homme est plus foncée que celle de l'enfant, chez le nouveau-né elle est à peu près incolore.

Par *l'exercice musculaire*, à la suite de fatigue, les urines changent de couleur et deviennent plus ou moins foncées. Chez le bien portant donc la couleur de l'urine varie avec bien des facteurs (temps, alimentation, âge, genre de vie) et par suite la quantité de matière colorante change.

A ces causes de variations, il faut ajouter *l'action de l'air et des réactifs chimiques* qui font subir des transformations dans la teinte des urines.

Les matières colorantes qui colorent ainsi l'urine de l'homme sain peuvent dans une classification des pig-

ments former le groupe des *pigments normaux* ; ils donnent à l'urine sa coloration propre, quoique ces substances soient imparfaitement connues ; il semble bien que la coloration très variable n'est pas due à un principe unique.

De plus, parmi ces pigments normaux, les uns sont formés à l'émission et d'autres apparaissent sous l'action de l'air et de la lumière, ce sont ces dernières substances, principes générateurs de pigments à qui l'on donne le nom de chromogènes ; ils sont incolores à l'émission et teintent bientôt l'urine sous l'influence des réactifs physico-chimiques.

Si on s'adresse non plus à l'homme sain, mais au malade, la couleur de l'urine change et par suite les pigments urinaires normaux varient et l'urine est colorée par des pigments *dits pathologiques*. Chez les diabétiques, dans certains cas de crises nerveuses de l'hystérie, les troubles hypophysaires, la polyurie étant très grande, l'urine est peu colorée et la quantité de pigment est très faible, elle varie en proportion de la dilution. Par contre, on voit l'urine se foncer quand la concentration augmente, elle séjourne dans la vessie et s'enrichit non seulement en ses constituants (urée, chlorures, phosphates, etc.), mais encore en matière colorante.

Dans ces cas l'urine ne contient pas de pigments anormaux.

Il n'en est pas de même chez les urines foncées, souvent elles sont rouges, rouges grenat, parfois noires et dénotent un état pathologique certain.

La présence de *pigments biliaires* donne à l'urine une coloration jaune, jaune verdâtre, rouge.

La matière colorante du sang et ses dérivés directs hémoglobine, méthémoglobine ou autres produits dérivés) colorent parfois l'urine en rouge vermillon ou rouge violacé.

L'urine violacée se rencontre de même chez certains typhiques et cholériques où la production anormale d'indican aux dépens de l'indol fonce la couleur de l'urine.

Les urines hémaphéiques contenant un excès d'urobilin fébrile sont d'un beau rouge.

Enfin l'urine noire donnée par certains malades atteints de *cancer mélanique* contient un pigment analogue aux tumeurs du même nom, il colore en noir par action des corps oxydants.

Les pigments sanguins, biliaires, indoxyliques, hémaphéiques, mélaniques, concourent à la coloration de l'urine mais de *l'urine pathologique*.

Enfin, à ces pigments normaux et pathologiques, on peut ajouter les pigments d'origine *médicamenteuse*.

L'élimination par la voie rénale de médicaments comme le séné, la rhubarbe, la créosote, la chélidoine, la santoline, le safran, l'acide phénique, modifient la couleur de l'urine qui peut prendre toutes les teintes depuis le jaune, le vert, le brun, jusqu'au noir.

Il serait trop long d'énumérer tous les corps qui changent la couleur de l'urine, le rein éliminant par ce liquide une grande partie des toxiques et des substances colorées que l'organisme ne peut assimiler.

L'énumération des facteurs divers qui influenceraient la couleur de l'urine, permet de se rendre compte qu'il est indispensable au milieu de cette complexité de

colorants urinaires de ne s'adresser qu'à une classe précise de ces éléments. Aussi pour la simplicité de l'exposition et afin d'éliminer de nombreuses causes d'erreurs, nous nous sommes efforcé de ne travailler que sur les *pigments normaux de l'urine*.

Nous avons éliminé l'étude des pigments dans les urines colorées, rouges, brunes et noires, ne considérant comme urine normale que l'urine de couleur ambrée d'un individu sain à diurèse courante, opérant sur l'échantillon moyen résultant du mélange des diverses émissions de vingt-quatre heures.

Sur cette urine normale, nous avons essayé d'extraire le principe colorant afin d'en faire l'étude.

B. — HISTORIQUE

Difficulté de la question nécessitant un historique.
Historique. — Résumé et classification des pigments.

On s'est préoccupé depuis bien longtemps de connaître les matières qui colorent l'urine et, bien que cette question représente un problème chimico-biologique des plus complexes, il n'a pas moins suscité une multitude de travaux, de théories, d'opinions et de résultats.

Si l'on jette un coup d'œil rapide sur les publications récentes et anciennes, on est frappé par leur nombre et aussi par la divergence des opinions sur la question des colorants urinaires. La terminologie est si confuse dans cet amas de noms dont beaucoup désignent un même corps qu'il est difficile de s'y reconnaître.

La complexité de la question provient de diverses causes dont les principales sont les suivantes :

Tout d'abord les substances *colorantes sont très instables*, elles subissent les actions des agents atmosphériques et chimiques, les unes n'apparaissent que sous l'action de ces agents, les autres se transforment et se présentent sous des aspects variés. Il faut tenir compte aussi de l'action des réactifs et souvent, on décrit sous le nom de variétés d'urochrome, des substances qui ne sont que des produits artificiels de laboratoire.

D'autre part, *l'absence de propriétés vraiment caractéristiques* augmente de plus l'obscurité du problème ; aucune de ces substances n'a, en effet, ni réactifs précipitants ni dissolvants propres et il est difficile de les caractériser.

La difficulté de cette étude est augmentée encore par la peine que l'on a à se procurer une *quantité pondérale* de ce corps vu la faible proportion que contient l'urine.

Enfin la *nomenclature compliquée* des auteurs ajoute encore un manque de clarté à la question.

Aussi est-il intéressant de faire un historique qui permette de se rendre compte des progrès de la biologie sur le terrain des pigments urinaires.

En effet, les auteurs ne sont pas d'accord quant au nombre, quant à la dénomination des matières colorantes urinaires ; il faut remarquer pourtant que depuis les premiers travaux de PROUST en 1798, période de confusion où la diversité des opinions démontre l'obscurité des connaissances à ce sujet, l'étude des pigments urinaires a fait un très grand pas et chimiquement parlant le siècle nouveau apporte dans le domaine des colorants des découvertes nouvelles.

1798. — FOURCROY et VAUQUELIN [28] tentent les premiers de résoudre ce problème. Ils incriminent la substance propre de l'urine comme raison de sa couleur.

1799. — PROUST [86] fait une étude des matières colorantes de l'urine, il publie ses premières recherches en langue espagnole. Il trouve dans l'urine une substance rouge qu'il retire de l'extrait urinaire appelé par lui « résine urinaire ».

En 1820, il complète son étude de la « *résine urinaire* » au point de vue chimique : c'est, dit-il, du purpurate d'ammoniaque, un produit de transformation de l'acide lithique. L'urine normale comprendrait donc deux substances colorantes, l'une rosacée, l'autre résineuse fauve.

1811. — VAUQUELIN [106] s'adressant à des urines pathologiques en retire « l'acide rosacique » dont il ne donne pas d'ailleurs la constitution : seules ses propriétés acides attirent son attention.

1840. — BERZÉLIUS [3], dans son dictionnaire de chimie, confirme les résultats de PROUST et montre que la résine urinaire ainsi que la substance noire ne sont que des transformations d'une substance appelée « *halophile* ». Il cite d'autre part les travaux de WÜRTZER [113] qui démontrent que « l'acide rosacique » de VAUQUELIN ne serait qu'un produit de transformation des acides. Il semble avoir, un des premiers, découvert l'existence des substances chromogènes.

1841. — SIMON [98] donne à la substance acide le nom d'uroérythrine.

1842. — LEHMANN [54] indique, l'année après, une méthode d'obtention de la matière colorante par congélation ; elle est soluble dans l'éther et l'alcool.

1842. — SCHARLING [92], employant également le froid, appelle « *omichmyloxid* » cette substance, elle contient des acides divers, minéraux, benzoïques et hippuriques.

1844. — LIEBIG [57] reprend les travaux de PROUST et conclut que la résine urinaire provient de l'action de l'air sur l'urine.

1852. — MARCET [65] retire de l'urine par action combinée de l'alcool et de l'éther, une substance rougeâtre résineuse.

1851. — GUBLER [33] étudie les pigments pathologiques.

1854. — HELLER [38] isole un pigment urinaire c'est « l'uroxanthine » qu'il identifie avec l'uroérythrine et l'urrhodine.

1857. — EISELT [25] complète les études sur les pigments pathologiques.

1857. — SCHERER [93] obtient par action du sous-acétate de plomb une substance brune soluble dans l'alcool et les alcalis.

1857. — HARLEY [35] reprend la méthode du froid et retire par des dissolvants appropriés un pigment urinaire c'est l'urohématine qu'il fait dériver du sang.

1862. — TICHBORNE [104] extrait le pigment urinaire en combinaison chimique ; il le trouve soluble dans l'eau, dans l'alcool, insoluble dans l'éther. Il en fait l'analyse élémentaire, il en fait un dérivé de l'acide hippurique.

Jusqu'alors la question est bien obscure et toute cette période ne peut encore nous donner une idée précise de la constitution pigmentaire de l'urine.

Une deuxième période avec les travaux de SCHÜNCK, THUDICHUM, GARROD, DOMBROWSKI, HOLWEG, SALOMONSEN, MANCINI et WEISZ, apporte des connaissances plus approfondies. Nous allons essayer de résumer les découvertes obtenues.

Edward SCHÜNCK [96], de 1856 à 1866, reprend l'étude des colorants et parmi la nomenclature compliquée des pigments urinaires, il les ramène à deux, d'une part l'un soluble dans l'éther et dans l'alcool, c'est « *l'urian* » ; l'autre soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther, c'est « *l'urianine* ».

HASSAL [37] étudie les pigments dans quelques transsudats.

Enfin, le premier, THUDICHUM [103], presque en même temps que SCHÜNCK, retire de l'urine humaine un pigment, il lui donne le nom d'*urochrome*, dénomination

qui, plus tard, sera appliquée au principal pigment urinaire normal.

SALKOWSKI [90] étudie les pigments normaux et pathologiques et en donne une méthode d'analyse.

Alors apparaissent en 1868, les célèbres travaux de JAFFÉ [46]. Il découvre, dans l'urine, l'urobiline et en fait le principal colorant urinaire. Il donne son mode d'obtention et l'identifie avec l'urochrome de THUDICHUM. Il a des réactions chimiques et spectrales caractéristiques, c'est le pigment normal et fondamental de l'urine.

MALY [62] discute l'identification de l'urochrome et de l'urobiline, ce sont deux pigments normaux mais différents l'un de l'autre.

MÉHU [68] étudie en 1868 l'urobiline de JAFFÉ, c'est pour lui le pigment normal de l'urine.

L'analyse spectrale prend à cette époque, une grande importance et les travaux de VIERODT, BEAUME, HOPPE-SEYLER, GARROD, sur les propriétés spectrales de l'urine et des pigments urinaires vont permettre une différenciation entre les pigments.

VIERODT [109] démontre par l'analyse spectrale que l'urochrome est différent de l'urobiline, ce dernier pigment a un spectre caractéristique alors que l'urochrome n'en possède pas.

BEAUME [2] résume dans sa thèse les connaissances de son époque sur l'étude spectrale des pigments.

HOPPE-SEYLER [43] en cherche l'origine.

Macc MÜHN [60] complète l'étude des pigments urinaires, en particulier de l'urobiline.

UDRANSKY [105] de même étudie la genèse des matières colorantes urinaires.

STOKVIS [100], WINTER, contribuent à la connaissance des pigments.

L'étude de VIERODT est reprise par le travail de GARROD [29]. Il démontre que la couleur de l'urine est due à plusieurs pigments dont le plus important est l'urochrome.

L'absence de propriétés spectrales de ce pigment n'en exclue pas son existence, au contraire, ce caractère spectral permet de le distinguer de l'urobiline. Avec ces derniers auteurs, la tendance devient de plus en plus grande à voir dans l'urochrome un corps différent de l'urobiline, ce que l'analyse spectrale montra.

De 1891 à 1893, on trouve des publications sur l'urobiline, l'indirubine, l'urobiline vraie et réduite. Qu'il suffise de citer les travaux de MAIRET et BOSC [61], VIGLEZIO, RIVA [87], STUDENSKY [101], BOGOMOLOFF [7], HÉNOQUE [39], DENIGÈS [18].

1896. — SCHMITT [95], GAUTRELET [31], DISQUE et ROSIN, KRAMM [49], CHIODERA [14], VANG HAN HARLEY [36], RIVA DE PARMA, CORDIER [15], LINOSSIER [58], CREMER [17], LEFÈVRE [53], COTTON [16], HUGOUNENQ [44].

Ces études nombreuses apportent une large contribution à l'étude de l'urobiline et en particulier des chromogènes de l'urine, mais jusqu'alors, la question du pigment normal de l'urine n'est pas encore élucidée. Il est impossible, d'une façon précise, de se rendre compte au milieu de cette multitude de travaux de quelle matière colorante est redevable la couleur de l'urine normale.

La *résine rousse* de PROUST, le *colorant extractif* de LEHMANN, l'*omichmyloxid* de SCHARLING, le *pigment normal* de TICHBORNE, l'*uroxanthine* de HELLER, l'*urian* et l'*urianine* de SCHÜNCK, l'*urochrome* de THUDICHUM et

de GARROD sont autant de mots qui désignent un complexe chimique à composition très variée, peut-être un polypeptide complexe ou peut-être un produit de décomposition de ces polypeptides ?

En 1900, la question donc est encore obscure. On sait que l'urine contient des matières colorantes, soit à l'état de chromogène, soit à l'état de pigments tout formés. On connaît depuis les travaux de JAFFÉ [47] l'existence de l'urobiline, sa constitution, ses propriétés chimiques et spectrales, mais beaucoup de biologistes en font un pigment différent du pigment normal. L'urochrome prend à partir de cette période, dans l'histoire des pigments urinaires une place importante et son étude chimique va être un sujet de nombreux travaux qui se continuent à notre époque et aboutissent à faire de l'urochrome le pigment normal de l'urine.

On obtient en effet des données précises sur la constitution centésimale de l'urochrome. On l'extrait de l'urine par des méthodes chimiques, on en fait l'analyse élémentaire et tous les auteurs s'accordent à trouver dans la matière colorante de l'urine, d'une part du soufre, d'autre part de l'azote.

La découverte des acides oxyprotéiques par BONDZYNSKI et PANECK [10] permet une orientation nouvelle de l'étude des pigments. En effet, la grande découverte de DOMBROUSKI est de rapprocher le corps acide azoté et sulfuré qu'est l'urochrome des acides oxyprotéiques, corps également riches en soufre et en azote.

La technique récente d'extraction dans l'urine des acides oxyprotéiques a été mise au point par DOMBROUSKI, PANECK et BONDZYNSKI [8]; elle permet d'extraire de l'urine

les acides antoxyprotéiques, oxyprotéiques et alloxyprotéiques et l'*urochrome*.

KLEMPERER [48] en 1903, donne une extraction du pigment normal par l'action du noir animal. Il emploie un dosage colorimétrique dans l'urine : c'est l'*urochrome* qu'il extrait.

DOMBROWSKI [22], en 1908, publie son beau travail sur le pigment urinaire normal. Il en donne et les propriétés chimiques et les modes de préparation qu'il publie avec BROWINSKI [11]. Ces travaux aboutissent à montrer l'importance capitale du pigment urinaire normal, l'*urochrome*. C'est maintenant un corps connu à réaction caractéristique et dont la variation dans l'urine peut-être considérée comme un élément de diagnostic dans certains cas.

Bocchi et GHELFI [6] et OLIARI [81] contribuent à l'étude des acides protéiques dans l'urine ainsi qu'à leur rapport avec l'*urochrome*.

Bocchi [5] donne une méthode d'extraction de l'*urochrome*.

LIEBERMANN [56] étudie l'*urochrome* de DOMBROWSKI, dont il discute la composition et les propriétés.

La même année, de nombreuses publications sont faites sur les pigments.

F. LIPPICH [57], MUELLER [72], L. LEWIN, A. MIETHE, E. STENGER [55] apportent leur contribution à cette étude.

HOLWEG [40] donne de l'*urochrome* des propriétés voisines de celui de DOMBROWSKI ; il en fait l'analyse quantitative. Il publie une méthode de préparation avec SALOMONSEN [91] au moyen du noir animal, ainsi que MANCINI [63].

Enfin, les travaux de WEISZ [111], ces dernières années, viennent compléter cette longue série de publications et d'études des colorants urinaires et après la découverte de l'urochrome, la tendance actuelle est de rechercher et son origine et sa transformation dans l'économie.

La molécule complexe qu'est ce pigment essentiellement instable subit de telles variations que les différentes méthodes employées pour l'extraire de l'urine semblent nous donner un produit très différent, suivant les réactifs employés ; mais, malgré cela, il semble établi que l'urine humaine comporte un pigment acide azoté et sulfuré. Quel que soit le mode de préparation, l'urochrome de THUDICHUM, l'urochrome de GARROD, l'urochrome de DOMBROWSKI, l'urochrome d'HOLWEG et l'urochrome de WEISZ sont un même pigment qui donne à l'urine sa couleur.

**Résumé de l'état de la question des pigments
d'après l'étude historique.**

En résumé, si l'on veut en quelques lignes montrer l'état de la question des pigments, on trouve que :

A l'époque de JAFFÉ, il semble indiscutable que l'urobiline est un pigment retiré de l'urine, et pour MACC MÜHN, MÉHU, HÉNOQUE, GAUTRELET, l'urobiline semble le pigment urinaire normal qui colore l'urine et lui donne ses propriétés spectrales. Les diverses appellations des anciens auteurs sont une seule et même substance à divers états de pureté.

Pour d'autres biologistes, il existe dans l'urine des substances non colorées à l'émission qui, sous l'action d'agents atmosphériques et chimiques apparaissent : ce sont des *chromogènes*, les travaux de LEFÈVRE, SCHMITT,

HÉNOQUE nous font connaître ces nouveaux principes pigmentaires.

A côté des chromogènes et de l'urobiline, on considère à notre époque que *le pigment normal de l'urine est l'urochrome*.

La tendance devient de plus en plus à en faire une individualité chimique, différente par ses propriétés spectrales et chimiques de l'urobiline.

GARROD tente de le démontrer par l'analyse spectrale. MALY, LEFÈVRE, SCHMITT, le différencient complètement de l'urobiline de JAFFÉ et les travaux de DOMBROWSKI, ces dernières années, affirment son caractère d'acide azoté sulfuré, seul principe colorant de l'urine.

Enfin, les auteurs de notre siècle sont arrivés à réduire le nombre des pigments nouveaux de l'urine et les principales matières colorantes de l'urine normale peuvent être résumées dans le tableau suivant dû à M. HUGOUNENQ.

Urobiline et son chromogène *urobilinogène*.

Uroerythine et son chromogène *uroerythrinogène*.

Urochrome et son chromogène *urochromogène*.

L'indican et *l'indirubine* dérivés de *l'indoxyl*.

D'après ce tableau, l'urobiline est différente de l'urochrome ; elle existe en faible quantité par rapport au pigment important l'urochrome. Il en est de même de l'uroerythrine considérée par SIMON, HUGOUNENQ, GAUTRELET, SCHMITT, NEUBAUER [78], comme le troisième pigment fondamental.

Enfin, les traces de pigments indoxyliques qui se trouvent dans l'urine complètent cette liste des couleurs urinaires.

C. — MÉTHODES D'EXTRACTIONS

Principes généraux. — Méthodes physiques. — Méthodes au noir animal. — Méthodes au sous-acétate de plomb. — Méthodes par combinaisons chimiques. — Méthodes au sulfate d'ammoniaque.

La matière colorante de l'urine est en faible quantité par rapport au volume du liquide qu'elle colore ; aussi l'étude des pigments urinaires comportera-t-elle un mode d'extraction qui tiendra compte et de la faible quantité du produit dans l'urine et des propriétés chimiques des pigments urinaires.

Les méthodes employées depuis les travaux de BERZÉLIUS et PROUST sont basées sur les principes suivants :

L'urine est concentrée par des *moyens physiques* (chaleur, congélation) et on épuise le résidu par des dissolvants appropriés d'où on retire le pigment.

Un autre mode est de *fixer le pigment* sur un corps capable de l'absorber (noir animal, sous-acétate de plomb, eau de baryte, lait de chaux), puis le substratum est épuisé par des dissolvants divers qui isolent la matière colorante.

Le pigment peut être mis *en combinaison chimique* d'où on le retire par action des réactifs.

Enfin, une quatrième méthode fait passer la matière colorante en solution, grâce à la présence d'un corps saturant l'urine (telle l'action du sulfate d'ammoniaque) ; de la solution riche en pigment, on extrait le principe colorant, après combinaison et décomposition.

L'action des dissolvants est d'un grand intérêt dans toutes les méthodes d'extraction. En effet, selon l'emploi d'un solvant, la purification du produit est plus ou moins parfaite ; ils agissent sur les colorants, si bien que l'urochrome d'un auteur n'est pas le même que celui obtenu comme tel par une autre méthode. Donc, dans l'extraction, il faudra toujours tenir compte de l'action des réactifs employés.

Les dissolvants agissent donc sur les extraits urinaires en solubilisant une majeure partie des principes colorants, tels sont l'acétone, la pyridine, l'alcool éthylique.

D'autres, par leur non miscibilité à l'urine, en présence de sulfate d'ammoniaque à saturation, s'emparent de la matière colorante d'où on peut la retirer facilement, tels sont le chloroforme, le xylol, la benzine, le sulfure de carbone, le tétrachlorure de carbone, l'éther, l'alcool amylique, l'acétate d'amyle.

Parmi tous ces liquides, les derniers solvants sont les plus employés : les uns servent dans le cours des manipulations à séparer les pigments, et d'autres sont des agents de purification.

On peut, pour la commodité de l'exposition, réunir les diverses méthodes d'extraction de l'urochrome que nous allons étudier rapidement sous cinq grands chefs :

- 1° Méthodes basées sur l'emploi des moyens physiques de concentration de l'urine ;
- 2° Méthodes appliquant les propriétés du noir animal de fixer les matières colorantes de l'urine ;
- 3° Méthodes employant l'acétate de plomb comme fixateur du pigment ;

- 4° Méthodes chimiques faisant rentrer les pigments en combinaisons chimiques avec les sels de cuivre ;
- 5° Enfin, méthode au sulfate d'ammoniaque ; ce sel permettant le passage des colorants dans des solvants.

1° Méthodes physiques de concentration de l'urine.

Si on étudie le premier groupe de ces méthodes, on trouve l'emploi de la congélation comme mode de concentration de l'urine.

C'est LEHMANN [54] qui, le premier, concentre l'urine par le froid ; le pigment est en combinaison saline. Il extrait par le vide, l'alcool et l'éther, le pigment urinaire.

SCHARLING [92], à la même époque, emploie le froid dans l'extraction des pigments. Un traitement par l'éther dissout la matière colorante qui est traitée successivement par la potasse, l'acide sulfurique et purifiée par l'éther.

Le produit obtenu dans ces deux méthodes est impur, il ne peut être comparé avec l'urochrome des auteurs, l'*omichmyloxid* de SCHARLING contient des corps étrangers aux pigments.

MAR CET [65] fait évaporer l'urine à chaud et traite le résidu par l'alcool et l'éther, ce dernier liquide précipite la matière colorante qui est insoluble dans ce solvant.

La méthode de PROUST [86] peut se rattacher à ce groupe ; en effet, il concentre de même l'urine par la chaleur jusqu'à consistance d'un sirop urinaire qu'il traite par les acides minéraux. L'huile sombre obtenue prend

l'aspect d'une résine urinaire insoluble dans l'eau. Il obtient de même une substance noire insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

2^e Méthodes d'extraction de l'urochrome par fixation sur le noir animal.

Le noir animal, produit absorbant, peut s'emparer des pigments et décolorer complètement l'urine et il sert ainsi de substratum sur lequel les dissolvants peuvent agir pour séparer les matières colorantes les unes des autres.

Il en est ainsi dans la méthode d'extraction de l'urochrome (MELLAMBY et THOMAS [71]).

On sature une urine de noir animal. On lave après filtration le noir animal avec de l'eau chaude, afin d'éliminer les autres constituants de l'urine. On continue le lavage avec de l'alcool légèrement sodé qui s'empare de l'urochrome ; le mélange est neutralisé par l'acide sulfurique qui entraîne la soude à l'état de sulfate. Après précipitation par l'alcool, on lave alors le pigment souillé d'urobiline par l'éther et on le sèche dans le vide.

Le noir animal trouve aussi son utilisation dans les méthodes d'HOLWEG [40], SALOMONSEN [91] et MANCINI [63] qui, après avoir traité les urines, soit par la baryte, soit par la chaux, fixent l'urochrome par le *noir animal* et l'extraient par un courant d'acide acétique.

L'urine est traitée par du chlorure de calcium et de la chaux ; elle est neutralisée par l'acide chlorhydrique et concentrée en un liquide sirupeux.

On dilue alors dans l'eau contenant du noir animal, qui s'empare du pigment ; on le lave à l'eau pour enle-

ver le chlore et après l'avoir fait sécher sur des plaques d'argile, on le traite par l'acide acétique dont on se débarrasse après traitement à l'éther ou par distillation.

Cette méthode est simplifiée par SALOMONSEN, qui remplace l'agitation dans la suspension du noir animal en faisant couler l'urine concentrée sur des colonnes de noir animal.

Enfin MANCINI, jugeant que la concentration altère ces molécules altérables, ne concentre pas l'urine, mais emploie le même procédé quant à ses réactifs.

A cette méthode, on peut rattacher celle de KLEMPERER [48], LIPPICH [59] et HARLEY [35].

3° Méthodes au sous-acétate de plomb.

Une urine traitée par le sous-acétate de plomb donne un liquide clair complètement décoloré. Cette propriété du sous-acétate de plomb est employée dans la préparation de l'*urochrome* de TUDICHUM [103].

Il opère ainsi : l'urine fraîche est traitée par l'acétate de baryte et l'eau de baryte jusqu'à réaction alcaline. On filtre au bout de 24 heures, on additionne de sous-acétate de plomb ammoniacal, on acidule par l'acide sulfurique dont l'excès est neutralisé par le carbonate de baryum.

On filtre et on dirige dans la liqueur un courant de gaz carbonique qui met l'*urochrome* en liberté ; on le purifie par l'acétate de mercure, puis, on décompose le produit mercuriel par l'hydrogène sulfuré : l'*urochrome* se dépose sous forme de croûtes jaunes.

Le procédé de JAFFÉ [46] pour l'extraction de l'*urobiline* est basé sur les propriétés du sous-acétate de plomb ;

il ne donne que l'urobiline, mais il est intéressant de l'étudier, car la discussion de ce procédé donne des clartés sur la différenciation de l'urobiline et de l'urochrome.

Ce principe est le suivant : l'urine étant décolorée par le sous-acétate de plomb, les pigments se combinent en sels plombiques qui, traités par l'alcool, cèdent à ce dissolvant l'urobiline que l'on peut séparer.

JAFFÉ opère en traitant les urines par l'ammoniaque et le chlorure de zinc ; il obtient des flocons rougeâtres qui sont lavés à l'eau. On épuise alors le résidu par l'alcool et le pigment par l'acétate de plomb ; on lave alors le précipité par l'alcool et l'acide sulfurique, auquel on ajoute du chloroforme. On sépare l'urobiline en solution chloroformique.

La *discussion* de ce procédé a été faite par LEFÈVRE [53] en 1898 ; il démontre que le chloroforme contient l'urobiline, mais que les eaux de lavage et la couche supérieure aqueuse pendant le traitement chloroformique renferment une substance colorante qui doit être un pigment autre que l'urobiline et ce pigment, insoluble dans le chloroforme, n'est autre que l'urochrome.

LEFÈVRE sature les solutions aqueuses légèrement colorées par du sulfate d'ammoniaque, il obtient une couche aqueuse ambrée contenant un pigment sans action sur le spectre, c'est le pigment fondamental de l'urine, l'urochrome de THUDICHUM.

Le procédé de MACC MÜHN [60] emploie aussi le sous-acétate de plomb ; il décompose le précipité de sous-acétate de plomb et d'acétate de plomb par l'alcool aiguisé d'acide sulfurique ; il filtre, et ajoute du chloroforme

après avoir additionné d'eau : le pigment passe intégralement dans le chloroforme.

Mais LEFÈVRE, discutant cette méthode, montre que ce dernier procédé, par les diverses manipulations qu'il entraîne, supprime complètement l'urochrome car en présence d'eau, d'alcool et de chloroforme, l'urochrome ne passe pas dans la solution alcoolique comme le fait l'urobiline.

A cette méthode de séparation par le chloroforme, on peut rapprocher celle de MAILLARD [64] qui sépare les matières colorantes de l'urine par l'action des acides et du chloroforme ; ce dissolvant s'empare des pigments par lavages successifs du chloroforme. Grâce à cette méthode, il sépare d'une part les matières colorantes solubles dans l'eau et dans l'alcool, d'autre part les principes colorants solubles dans l'alcool.

4° Méthodes d'extraction de la matière colorante de l'urine par combinaison de celle-ci avec des réactifs chimiques.

C'est DOMBROWSKI [22] qui donne de l'urochrome une méthode de dosage basée sur les propriétés suivantes du pigment urinaire normal :

Le pigment urinaire donne, avec le sulfate de cuivre additionné de bisulfite de soude ainsi qu'avec l'acétate de cuivre à froid en milieu ammoniacal, des combinaisons cuivriques insolubles dans l'eau.

Le pigment urinaire est réducteur et met l'iode en liberté en présence d'acide iodique, il est dosé par l'hypo-sulfite de soude.

DOMBROWSKI élimine les sulfates, les phosphates, les carbonates et presque toute la totalité de l'acide urique.

par addition d'acétate de baryum ou de calcium. (L'urochrome passe à l'état de sel alcalino-terreux soluble dans l'eau).

L'urochrome est alors précipité sous forme de combinaison cuivrique avec l'acétate de cuivre. En neutralisant par l'ammoniaque, on décompose par un courant d'hydrogène sulfuré, dont l'excès est enlevé par un courant de gaz carbonique ; on évapore alors la solution dans le vide et on obtient l'urochrome.

BROWINSKI et DOMBROWSKI [11] séparent l'urochrome ainsi obtenu des composés puriques qui le souillent par combinaison avec l'azotate d'argent. Ils déterminent alors l'azote du composé argentique et purique et l'azote du composé cuivrique et, par différence on a l'azote de l'urochrome d'où on en déduit la quantité d'urochrome.

On peut de même doser le soufre dans ce composé cuivrique, les sels cuivriques d'urochrome sont solubles dans l'ammoniaque sans subir de modifications dans leur teneur en soufre.

Enfin, on s'appuie sur les propriétés réductrices de l'urochrome qui réduit l'acide iodique à froid. L'iode en liberté est extrait par le sulfure de carbone et dosé à l'aide d'une solution titrée d'hyposulfite de soude, on en déduit la quantité d'urochrome.

TICHBORNE [104], déjà en 1862, bien avant DOMBROWSKI, employa aussi la combinaison cuivre et urochrome dans sa méthode d'extraction des pigments.

Il emploie une solution ammoniacale de nitrate de cuivre additionnée à une urine concentrée ; le liquide est neutralisé par l'acide sulfurique. Il obtient un précipité

auquel il incorpore la matière urinaire et l'albumine, il extrait l'urochrome par l'éther et l'alcool et le purifie par combinaison et décomposition.

5° Méthodes d'extraction des pigments à l'aide du sulfate d'ammoniaque et des solvants.

C'est MÉNU le premier qui, en 1871, employa le sulfate d'ammoniaque dans l'extraction des pigments urinaires. Il indiqua que ce sel permet l'extraction des pigments par sa présence à saturation dans une urine, il décèle la moindre trace de coloration.

Le sulfate d'ammoniaque est insoluble dans l'alcool absolu, dans l'éther, l'acétone ; il est, par contre, très soluble dans l'eau (il faut en employer autant que d'urine pour une précipitation parfaite). Si on sature une urine de sulfate d'ammoniaque l'action des dissolvants, tel que l'alcool, l'acétone sera telle que tout le pigment passera en solution dans la couche inférieure et il sera aisé de séparer la matière colorante par évaporation de ces solutions.

Tel est le principe de toutes les méthodes de ce groupe.

Dans une note de l'Académie de Médecine en 1878, MÉNU [68] indique au moyen de sulfate d'ammoniaque une méthode d'extraction des pigments.

En effet, après avoir acidifié l'urine avec l'acide sulfurique, il la sature de sulfate d'ammoniaque. Il se produit alors des flocons qui se réunissent, mêlés au sulfate d'ammoniaque. On reçoit sur un filtre un produit de couleur rougeâtre, on lave le filtre avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque et on essore le filtre entre des feuilles de papier.

Le filtre est traité par l'alcool qui s'empare des pigments ; l'alcool est alors évaporé. Il ne contient pas de sulfate d'ammoniaque ni d'acide urique (ces deux corps sont insolubles dans l'alcool à 95°). Le produit obtenu* donne les réactions spectrales et la fluorescence avec les sels de zinc dues à l'urobiline, mais il contient de l'urochrome, ce n'est pas un pigment pur.

Une simple modification de ce procédé est la *méthode de CORDIER* [15], qui remplace l'essorage des filtres par des décantations successives de liquides.

En 1893, *STUDENSKY* [101], dans une publication à Saint-Petersbourg, indique de même l'emploi du sulfate d'ammoniaque à saturation dans l'extraction du pigment urinaire ; il épuise le mélange avec du chloroforme et l'obtient pas l'urochrome mais l'urobiline seule.

KRAMM [49] emploie le noir animal pour l'extraction des pigments urinaires comme dans la méthode de *HOLWEG* et *SALOMONSEN*, mais après lavage avec de l'eau, il le sature de sulfate d'ammoniaque et grâce à la présence de ce sel, les pigments passent dans une solution chloroformique de phénol. Il traite alors par un mélange d'éther et d'eau qui entraîne les colorants.

GAUTRELET [31] sursature dans une éprouvette graduée et bouchée à l'émeri un volume d'urine fraîchement émise; il ajoute de l'alcool à 95°, agite jusqu'à émulsion. Au bout de quelques temps, l'alcool surnage, il est plus ou moins rouge ; on le décante, l'évapore à basse température.

LEFÈVRE [53] de même emploie le sulfate d'ammoniaque à saturation dans l'extraction sans acidulation et en présence d'éther et d'alcool.

GARROD [29], qui a donné une étude très intéressante de l'urochrome, en donne une méthode d'obtention basée sur l'action du sulfate d'ammoniaque en présence de dissolvants et sur l'insolubilité de l'urochrome dans l'éther.

GARROD sépare les pigments les uns des autres par des dissolvants appropriés ; d'une part l'urobiline, les pigments indoxyliques, d'autre part l'urochrome.

L'urine est placée dans une ampoule à robinet ; elle est saturée de sulfate d'ammoniaque, puis filtrée. Le filtrat est traité par l'alcool ; le liquide se sépare en deux couches, l'une alcoolique rougeâtre contenant l'urobiline pure, l'autre est une solution saturée de sulfate d'ammoniaque légèrement colorée par l'urochrome. Il ajoute alors de l'éther acétique qui enlève les pigments indoxyliques. Il fait évaporer la solution qui est reprise par l'éther et le chloroforme, les dissolvants entraînent l'urobiline et laissent l'urochrome que l'on met en solution aqueuse. La solution d'urochrome ainsi séparée ne donne pas les réactions de l'indol ni celles de l'urobiline, c'est de l'urochrome pur.

CREMER [17], après saturation par le sulfate d'ammoniaque, l'extrait par la pyridine.

Bocchi [5] donne, dans un journal de physiologie et de pathologie, en 1907, une méthode qui donnerait de meilleurs résultats que celle de GARROD.

SCHMITT [95] sature de même l'urine par le sulfate d'ammoniaque, mais, au préalable, il enlève l'urobilinogène par l'acétate de plomb (seuls l'urobiline et son chromogène sont fixés sur l'acétate de plomb).

L'urochrome et son produit d'origine passe dans l'alcool amylique. On le fait évaporer ; on obtient un liquide

épais et visqueux duquel on retire par précipitation l'urochrome.

GUR [34] dans sa thèse sur la diazoreaction d'Ehrlich, isolé le produit diazoreactionnant et l'identifie avec l'urochrome. Il en donne ainsi la préparation qui ressort du troisième groupe de notre classification ainsi que de ce dernier.

D'une part, il met le pigment et son chromogène en combinaison plombique en précipitant les matières albuminoïdes avec le réactif de COURTONNE qui entraîne le colorant.

D'autre part, il traite le précipité par l'acide tartrique qui concentre le corps, le filtrat tartrique est traité par du sulfate d'ammoniaque à saturation, le pigment passe dans l'acétone, d'où on le retire.

Donc, l'étude de ces diverses méthodes d'extraction des pigments urinaires nous renseigne sur ces pigments eux-mêmes. Suivant les réactifs employés, nous obtenons soit de l'urobiline pure (МАСС МÜHN), soit de l'urobiline contenant de l'urochrome (JAFFÉ), soit de l'urochrome seul, à l'exclusion des autres pigments indoxyliques et urobiline.

L'urochrome de GARROD, l'urochrome de DOMBROWSKI représentent, semble-t-il, le véritable pigment urinaire, et le mode d'extraction de ces derniers auteurs semble bien isoler ce corps pour en faire un composé à propriétés chimiques, physiques, spectroscopiques, spécifiques.

La méthode que nous proposons dans ce travail et dont nous allons faire l'étude est celle du Professeur A. FLORENCE, nous allons essayer de montrer qu'elle est comme ces deux dernières citées (DOMBROWSKI et GARROD), une méthode sélective qui sépare de l'urine, l'urobiline et l'urochrome.

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LE PIGMENT URINAIRE OBTENU PAR LA MÉTHODE EXTRACTIVE DE A. FLORENCE

A. — MÉTHODE D'EXTRACTION

Méthode. — Réactifs. — Avantages de cette méthode.

Au cinquième groupe des méthodes d'extraction étudiées jusqu'ici, nous pouvons rattacher celle de A. FLORENCE. En effet, l'emploi du sulfate d'ammoniaque y est de première importance et les dissolvants utilisés la rapprochent d'ailleurs des dernières méthodes citées.

Le Professeur A. FLORENCE [27], dans un article du *Journal de Pharmacie de Lyon*, de 1910, indique une méthode d'extraction des pigments de l'urine. Il donne à son article le titre : « *Dosage des pigments hémaphéïques* ».

Or, cette dénomination semble indiquer que cette méthode est spéciale à cette catégorie de matières colorantes rouges qui colorent les urines dites hémaphéïques. Mais l'auteur écrit :

« *Le procédé très simple et très rapide auquel j'ai eu recours, constitue une méthode générale d'extraction et de séparation des pigments normaux, aussi bien que des pigments d'hydrolyse (indigotine scatolique) que j'ai pu isoler à un état aussi voisin de la pureté que peuvent le permettre des substances incristallisables.* »

Nous ne nous sommes adressé (comme nous l'avons indiqué dans notre introduction) qu'à des urines normales et non rouges (les urines hémaphéiques étant des urines pathologiques). Cette méthode, comme l'indique son auteur, pouvant servir à extraire et les pigments normaux (urobiline, urochrome) et les pigments anormaux, nous l'avons appliquée à l'urine non pathologique.

Il est indispensable, en effet, de diminuer la complexité de la question en éliminant les pigments étrangers qui peuvent se trouver dans l'urine, le résultat en garde toute sa généralité.

Le principe de cette méthode est le suivant :

L'urine est saturée par du sulfate d'ammoniaque qui permet le passage de la matière colorante dans de l'acétone. La solution acétonique est alors distillée, le résidu est repris par de l'alcool absolu qui s'empare du pigment. Après évaporation de l'alcool, l'urobiline est séparée par traitement au chloroforme, le produit restant est la matière colorante à étudier.

Nous allons étudier cette méthode, ainsi que le rôle des réactifs qui y rentrent en jeu, et indiquer les remarques faites par nous-même au cours des manipulations. Enfin, nous montrerons les avantages de cette méthode en comparaison avec celles précédemment citées :

1° La méthode elle-même.

Dans un entonnoir à brome (de forme cylindrique de préférence), on mélange l'urine rouge (nous employons l'urine normale ambrée) avec un cinquième de son volume d'acétone pure du commerce; puis on ajoute du sulfate

d'ammoniaque pulvérisé ou cristallisé en neige jusqu'à saturation.

Tout à coup l'acétone se sépare entraînant tous les pigments rouges. On soutire l'urine et on lave l'acétone avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque (pour enlever urée, acides...).

L'acétone contient de l'eau et partant du sulfate d'ammoniaque, un seul déshydratant est convenable, c'est le sulfate d'ammoniaque neigeux et sec.

On agite et bientôt il se sépare de l'eau : on soutire jusqu'à la dernière goutte et on distille dans le vide (à la lumière diffuse) l'acétone à siccité.

Le résidu est dissous dans l'alcool absolu, filtré et évaporé dans une capsule tarée.

On obtient ainsi les pigments hémaphéiques bruts totaux, on les traite par le chloroforme qui enlève l'urobiline vraie ; celle-ci est en petite quantité par rapport à un beau pigment rouge bien distinct. »

Tel est l'exposé de cette méthode.

2° Ce qui se passe dans la réaction. Rôle des réactifs.

Sulfate d'ammoniaque. — Le rôle du sulfate d'ammoniaque, comme dans les méthodes du cinquième groupe de notre classification des méthodes est de permettre, en effet, le passage des matières colorantes dans un dissolvant peu miscible à l'eau. A condition que le liquide à décolorer soit sursaturé de ce sel, le sulfate par sa présence fait passer les pigments d'un liquide à un autre : il rend possible l'extraction des matières colorantes de l'urine.

Par son *insolubilité* dans l'alcool absolu, l'éther, l'acétone, il est employé avec avantage dans ce dosage. En effet, l'acétone et l'alcool d'extraction du pigment ne s'emparent ainsi que de la matière colorante de l'urine, le sulfate d'ammoniaque restant en solution.

Un troisième rôle du sulfate d'ammoniaque *est son rôle de déshydratant* : c'est un corps au coefficient de solubilité très élevé (il faut 750 grammes de sulfate d'ammoniaque pour saturer un litre d'eau). On l'emploie dans le courant de la préparation à l'état neigeux et pour enlever l'eau que peut contenir la solution acétonique de pigment.

Acétone. — Parmi les dissolvants des matières colorantes, l'alcool, l'acétone et la pyridine sont les plus importants. Le Professeur FLORENCE emploie *l'acétone pure du commerce* qui a l'avantage de bouillir dans le vide à une température très basse, presque à froid, ce qui implique d'ailleurs un double avantage.

D'une part, cette propriété facilite la distillation qui peut se faire dans le vide avec une température basse.

D'autre part, « *en opérant ainsi, dit A. FLORENCE, j'ai pu me flatter de ne pas altérer ces délicates molécules* » car la chaleur détruit « *ces molécules réputées éminemment altérables* ».

Le rôle de l'acétone dans cette méthode est d'agir sur l'urine en solubilisant une grosse partie des principes colorants de l'urine. Ce solvant, facilement distillé, concentre la matière colorante dans un volume très restreint de liquide, qui se forme en une couche supérieure au-dessus de l'urine et peut facilement en être séparé par décantations successives.

L'alcool. — Le rôle de l'alcool absolu sur le résidu acétonique est de solubiliser la matière pigmentaire qui est soluble dans ce solvant et aussi d'enlever les dernières traces de sulfate d'ammoniaque qui se trouvent dans l'extrait.

Le chloroforme. — Enfin le chloroforme vient séparer les pigments obtenus par l'action combinée de l'acétone et de l'alcool. En effet, seul l'urobiline est soluble dans le chloroforme. Il s'empare de l'urobiline à l'exclusion de l'urochrome ; la réaction zincique au chlorure de zinc sera donnée par la solution chloroformique alors que le pigment rouge restant ne donnera pas cette réaction.

Nous avons appliqué cette méthode d'extraction des pigments urinaires sur trente litres d'urines. Ces urines étaient normales de couleur ambrée et correspondaient à un mélange d'urines d'individus sains.

Nous avons, pour un litre d'urine, ajouté 200 centimètres cubes d'acétone, cette quantité est suffisante pour la réussite de la réaction ; mais nous n'avons pu y réussir avec une quantité inférieure, quelle que soit la saturation de l'urine, la surface de séparation ne se faisant que difficilement.

Nous avons sursaturé le liquide par du sulfate d'ammoniaque cristallisé, ce sel est très soluble dans l'eau et par suite très soluble dans l'urine, aussi faut-il s'assurer de l'excès de sulfate d'ammoniaque par la présence de cristaux non dissous. Pour plus de sûreté, nous avons employé autant de sulfate d'ammoniaque que de liquide. En employant cette proportion on est certain d'avoir sursaturé le mélange.

Nous avons agité l'ampoule à décantation. Au début, elle présente un liquide trouble contenant en suspension des cristaux de sulfate d'ammoniaque. Au bout de quelques minutes de repos, on aperçoit très rapidement (presque brusquement) se former une surface de séparation. On se trouve en présence d'une couche de liquide ; à la partie supérieure elle est rouge : c'est l'acétone, elle contient des matières colorantes.

La couche inférieure est l'urine complètement décolorée, sursaturée de sulfate d'ammoniaque.

Suivant la technique, nous avons soutiré le liquide incolore. Lorsqu'on approche de la solution acétonique, l'urine décolorée tient en suspension des flocons grisâtres qui se trouvent à la séparation de l'acétone et de l'urine. Le lavage avec la solution saturée de sulfate d'ammoniaque les entraîne et avec eux l'urée, l'acide urique et autres produits contenus dans l'urine. Nous avons alors ajouté du sulfate d'ammoniaque sec afin de déshydrater le mélange. Cette réaction est difficile à obtenir car il faut renouveler plusieurs fois l'action du sulfate, jusqu'à ce que l'acétone soit entièrement déshydratée. Cette condition sera une des causes de la pureté du produit par la suite.

La distillation de l'acétone dans le vide se fait facilement, vu la faible température qu'il faut fournir pour la distiller. Nous avons ajouté d'ailleurs des morceaux de porcelaine dans le liquide pour faciliter l'ébullition.

Nous avons obtenu une masse noirâtre à odeur âcre et désagréable ; elle contient les pigments et très souvent du sulfate d'ammoniaque qui est resté en solution dans la déshydratation incomplète de l'acétone.

Nous avons épuisé ce mélange par l'alcool absolu qui s'empare des pigments à l'exception du sulfate d'ammoniaque insoluble dans l'alcool absolu. Il est très difficile d'éliminer du résidu sirupeux des cristaux de sulfate d'ammoniaque. Nous avons opéré de deux façons :

D'une part, par filtration sur du papier filtre, les cristaux forment un dépôt rougeâtre, cristallin ; par filtration lente, nous avons pu séparer ce sulfate d'ammoniaque en le lavant par de l'alcool absolu jusqu'à ce que l'alcool passe entièrement incolore. On trouve alors sur le filtre une masse noirâtre très riche en sulfate d'ammoniaque, comme l'indiquent les réactions au chlorure de baryum et les réactions de l'ammoniaque. On a donc par cette méthode une solution alcoolique pure du pigment.

D'autre part, nous avons éliminé le sulfate d'ammoniaque au moyen de l'éther. Cette deuxième méthode nous a semblé plus rapide ; elle a été employée par GUR [34] dans le même but. Il écrit : « *l'éther anesthésique anhydre et privé entièrement d'alcool, bien que ne solubilisant pas l'extract obtenu, entraîne mécaniquement et à froid au travers d'un papier filtre la substance active sous forme de particules imperceptibles qui se réunissent au fond du vase à extraction en une couche sirupeuse brun foncé.* »

Nous avons opéré non pas sur l'extract mais sur la solution alcoolique très concentrée des pigments. Nous avons ajouté de l'éther anhydre qui a précipité le pigment sous forme d'une couche résineuse brun-rougeâtre. Le produit ne contient plus de sulfate d'ammoniaque.

On fait alors évaporer le liquide sirupeux jusqu'à siccité, il est d'odeur désagréable et incristallisable.

Nous avons séparé l'urobiline par le chloroforme. En ajoutant ce dissolvant aux pigments bruts totaux, nous retirons après séparation une solution chloroformique d'urobiline, d'une part; d'autre part, un produit hygroscopique rougeâtre que nous avons conservé dans une cloche à vide. Ce produit ainsi obtenu nous allons en faire l'analyse chimique et l'analyse spectrale et nous allons essayer de montrer son identité avec l'urochrome des auteurs, alors que la solution chloroformique nous donne les réactions de l'urobiline. Nous avons fait agir le réactif de FLORENCE [27] (solution chloroformique d'acétate de zinc, d'alcool et de pyridine) qui donne, en présence d'urobiline, une magnifique coloration verte fluorescente.

Le liquide chloroformique extractif est traité à volume égal avec le réactif ; après repos, la couche inférieure est d'un beau vert.

Nous avons donc extrait d'une part l'urobiline par le chloroforme, d'autre part le pigment urinaire par l'alcool.

3° Quels sont les avantages de cette méthode ?

Le premier avantage déjà cité est dans l'emploi de l'acétone comme liquide d'extraction; jusqu'alors, en effet, c'est l'alcool amylique employé par SCHMITT [95], l'éther acétique de la méthode de GARROD [29] qui extraient les colorants. Or, A. FLORENCE, en parlant de l'incertitude qui règne sur la question des pigments, écrit : « *L'incertitude qui règne en cette question provient de la difficulté de l'extraction de ces molécules réputées éminemment altérables ; les réactifs employés : alcool amylique, qui bout à une température trop élevée, l'éther acétique et*

acide chlorhydrique, etc., etc., sont trop destructeurs ».

La difficulté de l'extraction tient surtout à la fragilité des molécules de ces matières colorantes ; le grand avantage de cette méthode est d'opérer à des températures relativement basses et avec des réactifs qui n'altèrent pas les produits colorants.

La simplicité et la rapidité de la préparation sont aussi des qualités de ce procédé ; il demande des produits courants et des appareils simples.

Enfin et surtout cette méthode est générale, elle permet en effet la décoloration complète de l'urine et l'obtention d'un produit contenant tous les pigments normaux de l'urine, de même que les pigments anormaux si on s'adresse à des urines pathologiques, mais dans le cas qui nous intéresse elle nous permet l'étude du pigment normal de l'urine.

B. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET RÉACTIONS DE LA SUBSTANCE EXTRACTIVE COLORANTE

Caractères organoleptiques. — Solubilité. — Action de l'air et des oxydants. — Action des acides. — Action des bases. — Action des réactifs.

Nous avons donc obtenu par la méthode de A. FLORENCE une masse résinoïde dont nous allons faire l'étude au point de vue physique et chimique.

Pour cette étude nous nous sommes reporté aux caractères donnés par le pigment normal de l'urine, *l'urochrome*, et nous avons essayé de montrer que notre produit s'identifiait avec l'urochrome lui-même.

Caractères organoleptiques.

Après l'action du chloroforme, le produit de notre préparation dépourvu d'urobiline, se présente sous la forme d'une masse résinoïde, amorphe, sorte de croûte rouge noirâtre, qui, desséchée dans une capsule, est d'un beau rouge sous faible épaisseur et d'une couleur brune goudronneuse sous plus grande épaisseur.

Le pouvoir colorant de la substance est faible, mais il augmente sous l'action des agents physico-chimiques.

C'est une masse *amorphe, incristallisable*, très *hygroscopique* ; conservé sous la cloche à vide, il reste à l'état de poudre rouge qui, au contact de l'air, se prend en une masse d'aspect résinoïde. Cette facilité à se dissoudre dans l'humidité de l'air complique l'étude de ce corps, et dans ses pesées et dans son mode de conservation.

Son odeur est âcre et désagréable et très persistante, qui augmente par l'action de la chaleur. Les vapeurs qu'il dégage en chauffant prennent à la gorge.

Solubilité.

La solubilité de ce produit est celle donnée par les auteurs pour l'urochrome vrai (urochrome de GARROD et de DOMBROWSKI).

Comme l'urochrome, ce produit est *insoluble dans l'éther* (ce qui le distingue de l'urobiline). L'éther le précipite de sa solution alcoolique et aqueuse, il sert dans la purification du produit ; c'est ainsi que dans la méthode de GARROD, l'éther est un agent de purification. Nous l'avons employé nous-même pour précipiter le pigment, à l'exception du sulfate d'ammoniaque.

Il est de même *insoluble dans la benzine, dans le sulfure de carbone, l'éther de pétrole, le toluène, le xylol et enfin, le chloroforme.*

Son insolubilité dans le chloroforme le distingue nettement de l'urobiline, ce dernier pigment est toujours extrait par le chloroforme et c'est par ce dissolvant qu'on le sépare des autres pigments dans notre méthode.

Il est soluble dans l'eau, à qui il donne une couleur rouge sans dichroïsme, la solution est très stable, surtout si elle est légèrement alcaline. Nous avons pu conserver plusieurs mois une solution de notre produit sans qu'il ne se fasse aucun dépôt et aucun changement dans la coloration.

La solution aqueuse dialyse lentement à travers le parchemin.

L'urochrome ainsi que notre résine urinaire sont solubles dans l'acétone, l'alcool amylique, la pyridine, l'alcool méthylique, l'alcool absolu, mais beaucoup plus dans l'alcool à 95°. Ces solubilités sont employées dans la préparation ; la solution alcoolique est relativement stable, mais à la longue pourtant, ces solutions se brunissent et il se produit un dépôt résineux, comme si une partie devenait insoluble ; si on remplace l'alcool par d'autre alcool absolu, on obtient un alcool incolore et une substance qui s'attache aux parois, elle est jaune marron et soluble dans l'eau. Nous avons observé après quelques mois qu'une partie de notre produit n'était plus soluble dans l'alcool absolu qui, pourtant quelque temps auparavant, avait servi à l'extraire ; ceci provient probablement de l'action oxydante de l'air.

La substance colorée n'est pas précipitée par le sulfate d'ammoniaque, elle partage cette propriété, de même que l'urochrome des auteurs. Cette propriété les distingue de l'urobiline. Le sulfate d'ammoniaque le fait passer en solution dans les solvants comme l'alcool et l'acétone.

Action de l'air et des oxydants.

L'action de l'air est parmi les propriétés de l'urochrome une des plus caractéristiques, elle est la même d'ailleurs sur notre substance extractive.

La solution aqueuse exposée à l'air brunit, noircit surtout si on l'acidule (nous avons vu au contraire précédemment que la solution alcaline est stable), on aperçoit souvent des flocons brunâtres se former.

L'oxygène et les oxydants, comme l'oxyde de zinc et l'oxyde de cuivre donnent un produit foncé. On a même prétendu que le produit obtenu était de l'urochromogène qui présenterait suivant certains auteurs un spectre d'absorption.

L'oxydation par le calomel donne de même un produit plus foncé. C'est ZAWARDSKI [115] qui a publié dans les « Archives de Médecine et de Pharmacie » cette oxydation de l'urochrome en milieu alcalin, il appelle *uroérythrine*, ce produit ainsi obtenu (pigment d'ailleurs connu depuis longtemps et considéré comme un pigment normal de l'urine).

L'oxydation plus énergique nous a donné un produit noir ; il en est ainsi par l'action de l'acide azotique, il se produit une hydrolyse d'oxydation exactement semblable à celle obtenue par l'action des mêmes réactifs sur l'urochrome, le produit obtenu est de l'uromélanine.

Par suite de l'action des oxydants, *il est réducteur*.

En présence des sels ferriques, nous obtenons, après un contact prolongé, les réactions analytiques des sels ferreux.

L'urochrome, après quatre heures de contact avec l'acide iodique, le réduit avec mise en liberté de l'iode qui vient colorer la solution.

Cette dernière propriété est employée dans la méthode de dosage de l'urochrome de DOMBROWSKI.

Nous avons essayé l'action de l'*hydrogène naissant* dégagé soit par l'action du zinc sur l'acide sulfurique, soit par l'amalgame de sodium ; notre produit n'a pas subi de modification, il en est de même de l'urochrome.

L'hydrogène, dans les mêmes conditions, n'a jamais pu faire passer l'urochrome à l'état d'urochromogène tel qu'il se trouve dans l'urine. Cet urochrome ne doit pas en dériver par oxydation.

Action des acides.

Nous avons fait agir les acides minéraux sur notre pigment et cette action se rapproche beaucoup de celle des oxydants. Ils agissent d'ailleurs de la même façon sur l'urochrome. La substance noircit et change d'aspect avec les acides chlorhydrique et sulfurique.

Nous avons placé dans un tube à essai une parcelle du produit en solution aqueuse. Si nous ajoutons quelques gouttes d'acide chlorhydrique et en ayant soin de chauffer, la masse noircit bientôt. Il semble se produire un corps semblable à celui obtenu par les oxydants sur l'urochrome. Mais deux conditions sont à remplir dans cette réaction : d'une part, il faut une ébullition prolongée, d'autre part une oxydation de l'air.

Action des bases.

Les bases, d'une part, permettent la stabilité de la solution, d'autre part, le produit brunit comme pour les acides. Si on élevait la température, les bases enlèveraient le soufre à l'urochrome, suivant certains auteurs.

L'ammoniaque ne modifie aucunement notre matière colorante, il en est ainsi de l'urochrome.

Il est condensé par le noir animal, le sous-acétate de plomb, les réactifs absorbants des pigments qui peuvent les extraire des urines, comme le montrent les méthodes basées sur ces procédés.

Nous nous sommes reporté pour cette étude aux propriétés généralement admises de l'urochrome. Il serait trop long de vouloir étudier ici les caractères physiques, les propriétés des divers urochromes des auteurs. Nous nous sommes arrêté à celles données par DOMBROWSKI [22] et GARROD [29], qui sont maintenant classiques.

Le produit de notre méthode nous a donné jusqu'alors les propriétés de solubilité de l'urochrome. L'action des réactifs courants, bases, acides, oxydants, réducteurs, semble correspondre à celle donnée par le pigment normal, l'urochrome.

Nous allons montrer qu'il est précipité par un grand nombre de corps de même que l'urochrome.

Action des réactifs divers.

Les sels d'argent précipitent l'urochrome et notre produit colorant. En solution aqueuse, le nitrate d'argent forme une combinaison de consistance gélatineuse, soluble dans l'acide azotique et l'ammoniaque ; le chlorure d'argent précipite lentement une solution aqueuse, mais plus rapidement une solution alcoolique.

Les sels de cuivre, l'acétate de cuivre et l'oxyde de cuivre précipitent intégralement l'urochrome. Cette propriété est employée par DOMBROWSKI dans le dosage de l'urochrome. La précipitation se fait en milieu fortement ammoniacal, en milieu acide ; nous n'avons pu l'obtenir.

L'azotate mercurique, le *sulfate de mercure*, l'*acétate de plomb*, le *sous-acétate de plomb*, ainsi que le *chlorure de zinc*, donnent, avec une solution aqueuse d'urochrome ou du pigment, un précipité.

Les acides *phosphorique*, *phosphomolybdique*, *phosphotungstique*, précipitent de même l'urochrome.

La solution d'*iodure de potassium* et d'*iodure double potassium et de mercure* ne donnent rien avec l'urochrome, il en est ainsi du *chlorure de mercure* et du *chlorure de baryum*.

La non précipitation avec le chlorure de baryum permet d'une part de s'assurer de l'absence de sulfate d'ammoniaque dans le produit ; d'autre part, elle le distingue des autres pigments qui donnent des réactions avec ce sel.

Il ne *réduit pas la liqueur de Fehling* et ne la décolore pas, ce qui montre qu'il ne possède pas de fonction cétonique et aldéhydique.

Il ne *donne pas de fluorescence en solution*. Nous avons essayé la réaction zincique avec le réactif de FLORENCE, en présence de deux à trois centimètres cubes de solution d'urochrome. Nous avons ajouté deux à trois centimètres cubes du réactif zincique, la couche inférieure est incolore, la présence d'urobiline dans ce cas est décelée par une magnifique coloration verte.

Cette réaction est très différentielle des deux pigments normaux de l'urine : urochrome et urobiline. Beaucoup d'auteurs, en effet, caractérisent l'urobiline par ses propriétés spectrales et par la réaction de fluorescence verte avec les sels de zinc. Ces deux réactions ne sont pas données par l'urochrome dépourvu d'urobiline par lavage avec le chloroforme.

Dans notre méthode, nous avons obtenu dans la solution chloroformique notre réaction zincique et le pigment lui-même ne l'a pas donnée.

D'après les travaux de GARROD, l'urochrome donnerait une légère *réaction des xanthoprotéines*. Nous n'avons pu l'obtenir. De même, nous y avons trouvé la *réaction* de BIURET et la *réaction* de MILLON entièrement négatives.

Au polarimètre, nous n'avons pu obtenir aucune déviation, il n'agit pas sur la lumière polarisée.

Nous avons recherché l'*indoxyl* avec le réactif à la diméthylamidobenzaldéhyde d'EHRlich. Nous n'avons pas obtenu de coloration rouge en présence d'acide chlorhydrique, ni de coloration bleue, ce qui indiquerait la présence de scatol. Notre pigment ne contient pas de dérivés de l'indoxyl. De même, la solution étendue à partie égale d'*acide chlorhydrique* et agitée avec du chloroforme, ne colore pas ce dernier, même en présence d'eau oxygénée, ce qui montre l'absence de l'indoxyl dans ce pigment.

D'après cette étude rapide des propriétés physiques de la matière colorante obtenue par la méthode de FLORENCE, il nous semble établi que ce produit est voisin de l'urochrome, il en possède un grand nombre de propriétés physiques. Les réactifs colorants et de précipitation agissent sur ce pigment comme sur l'urochrome de DOMBROWSKI. Nous concluons déjà à la similitude de ces deux matières colorantes ; l'étude chimique et spectroscopique du pigment urinaire va encore compléter cette identification.

C. — ÉTUDE SPECTRALE DE L'URINE ET EN PARTICULIER DE L'UROCHROME ÉTUDIÉ

Historique. — Etude comparative des spectres de l'urobiline et de l'urochrome.

I. — Historique.

Les propriétés des pigments urinaires, comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents, ne sont pas très spécifiques. En effet, les réactifs de coloration, de précipitation qu'ils possèdent, leur sont communes avec beaucoup d'autres corps ; aussi a-t-on cherché des caractères plus différentiels et c'est l'analyse spectrale qui a pris un grand intérêt dans l'étude des matières colorantes.

Vu la faible quantité de substance colorée que possède l'urine, la difficulté que l'on rencontre à se procurer une quantité pondérable du produit, l'analyse spectrale par le peu de substance qu'elle demande, trouve son avantage.

L'analyse spectrale permet une différenciation entre les pigments (les matières colorantes du sang ont un spectre tout à fait différent de celui de l'urobiline).

L'analyse spectrale permet de plus de se rendre compte du degré de pureté du corps ; un produit comme l'urochrome souillé d'urobiline donnerait les raies caractéristiques de ce dernier pigment.

Aussi l'analyse spectrale des urines a-t-elle fait le sujet d'un grand nombre de travaux : JAFFÉ [46], THUDICHUM [103], MÉHU [68], MALY [62], HOPPE-SEYLER [43], VIERODT [109], GARROD [29], etc., ont cherché les carac-

tères spectroscopiques de l'urine et des pigments isolés, afin d'essayer d'en faire un test de pureté et de différenciation.

THUDICHUM [103] qui a donné son nom à l'urochrome, pigment normal de l'urine, indique que ce corps donne une raie d'absorption caractéristique en solution acide, alcoolique ou aqueuse entre F et G, mais aucune raie d'absorption en solution alcaline ou neutre.

D'autre part, il fait agir l'éther sur la solution d'urochrome ; il obtient deux corps : l'un, soluble dans l'éther, c'est l'*acide omicholique* ; l'autre, insoluble dans l'éther, c'est l'*uropittine*.

Il trouve que l'*uropittine* montre en solution alcoolique une raie entre E et F semblable à celle de l'urobiline et que l'*acide omicholique* donne une fluorescence et une raie entre D et F.

Ces propriétés spectrales de l'urochrome de THUDICHUM n'ont pas été retrouvées depuis sur l'urochrome, elles proviennent de la préparation spectrale de THUDICHUM.

En effet, il est reconnu de nos jours que l'urine normale ne donne pas de bande caractéristique et que le pigment normal de l'urine, l'*urochrome*, qu'il soit obtenu par GARROD, DOMBROWSKI, HOLWEG, n'a pas de spectre d'absorption. Ce caractère, avec la réaction au chlorure de zinc (qui ne donne pas de fluorescence avec l'urochrome), sont les deux réactions différentielles de l'urobiline et de l'urochrome.

C'est l'étude de VIERODT [109]), en 1874 et 1876, qui met la question des pigments sur la voie de l'analyse spectroscopique. Il a démontré et depuis tous les auteurs ont

trouvé le même fait : que l'urine normale n'a pas de bande d'absorption caractéristique, elle donnerait simplement une bande sombre vers le violet du spectre, plus fencée vers le rouge. Il en conclut que le pigment urinaire n'est pas un corps simple, la connaissance spectroscopique de l'urine ne simplifie pas la question.

Pourtant il n'a jamais trouvé de bande d'absorption qui rapprocherait la matière colorante de l'urine de celle du sang ; aussi l'analyse spectrale du colorant urinaire permet-elle à Vicrodt d'assurer que la matière colorante de l'urine, l'*urochrome* (il l'appelle encore « *hydrobilirubine* », ne dérive pas du sang, elle se rapprocherait plutôt de la bile.

Mac Munn [60], en 1880, dans « The spectroscope in medecine », résume les connaissances de son époque à ce sujet quand il écrit :

« Il faut savoir qu'il n'y a qu'un seul pigment qui donne une bande d'absorption nette. L'urine normale contient un pigment dont le spectre en solution acide est caractérisé par une bande d'absorption à la bande F de FRAUENHOFER. Cette bande d'absorption se comporte (après le traitement par les réactifs) de la même manière que la substance obtenue par l'action de l'acide chlorhydrique sur la bile de JAFFÉ et du produit obtenu par MALY (bilirubine de MALY), ce qui amène à conclure que la substance qui en solution donne la bande F est l'urobiline.

A cette époque, seuls les caractères spectroscopiques de l'urobiline sont élucidés. JAFFÉ [46], HÉNOQUE [39], Macc Munn étudient l'urobiline et établissent ses caractères spectroscopiques. Ils en possèdent en effet de très

précis, alors que le pigment principal de l'urine n'a pas de bande.

C'est alors que l'étude des propriétés spectrales de l'urochrome sont étudiées par HOPP-SEYLER, GARROD, SCHMITT [95], GAUTRELET [31], LEFÈVRE [53], HUGOUNENQ [44], DOMBROWSKI [22], HOLWEG [40], etc... Ils ne reconnaissent aucune raie d'absorption du spectre lumineux, mais tous notent une extinction de la région violette du spectre.

D'après les procédés d'extraction de SCHMITT et LEFÈVRE, l'extinction se fait aux deux extrémités spectrales, plus avancée du côté du violet que du rouge : $\lambda = 640$ du côté du rouge, $\lambda = 472$ du côté du bleu.

L'urochrome de DOMBROWSKI ne donne ni en solution acide, ni en solution alcaline de bande d'absorption, pourtant il absorbe la région violette du spectre.

La limite de la bande obtenue est :

$\lambda = 470 - 468 \mu\mu$ en solution concentrée ;

$\lambda = 471 - 442 \mu\mu$ en solution diluée.

L'urochrome d'HOLWEG ne donne également pas de bande d'absorption, mais une bande diffuse au bord du spectre.

PLIMMER [83], en 1910, dans « Physiological chemistry », indique que l'urochrome ne donne pas de bande d'absorption. Il établit une séparation des deux pigments dans l'urine : l'urobiline donne son spectre caractéristique, l'urochrome une bande obscure dans le violet.

Enfin LEWIN, MIETHE et STENGER [55] ont établi que l'urochrome montre une bande plus foncée du côté des faibles longueurs d'onde, du côté du violet. Elle ne donnerait pas de bande dans l'ultra-violet.

II. — Etude comparative du spectre de l'urobiline et de l'urochrome.

L'historique précédent de la spectroscopie urinaire nous a montré l'absence des propriétés spectrales de l'urochrome d'une part, le spectre caractéristique de l'urobiline d'autre part.

Nous avons étudié l'action de notre produit d'extraction sur le spectre visible, afin de comparer ce spectre avec celui de l'urochrome des auteurs (PLIMMET, HOLWEG, VIERODT, GARROD, DOMBROWSKI, etc...).

Nous nous sommes adressé au spectre visible et en variant la concentration, la nature du dissolvant, la réaction du milieu, nous avons cherché l'action de l'urochrome sur le spectre dans ces conditions.

Nous avons opéré en solution, *soit aqueuse, soit alcoolique*, en milieu *alcalin*, puis *acide*, puis *neutre*.

Nous avons préparé des solutions à titre connu, solution diluée au 1/100^e et nous avons fait varier l'épaisseur du liquide et par suite la concentration en employant, soit la cuve de BALY, soit une série de cuves d'épaisseurs différentes (20 mm. 01, 10 mm., 5 mm. 04, 1 mm. 01).

Enfin nous avons fait agir des réactifs divers sur les solutions (ammoniaque, chlorure de zinc, aldéhyde acétique) et nous avons observé le spectre obtenu dans ces conditions d'expérience.

Une première expérience a été faite avec *une solution aqueuse neutre* de notre matière d'étude. Elle correspondait à un gramme de substance pour 100 centimètres cubes d'eau. Nous avons observé l'action de cette solution sur le spectre visible.

Nous avons placé la solution dans la cuve de Baly, afin de faire varier l'épaisseur du liquide. Dans ces conditions nous avons obtenu, quelle que soit l'épaisseur de la cuve, une bande sombre obscur du côté du violet, bande diffuse au bout du spectre, mais aucune bande d'absorption dans la région verte et le bleu cyané du spectre.

La bande sombre observée dans cette région de faible longueur d'onde a des limites qui varient avec l'épaisseur de la cuve, ce qui revient à dire, que l'intensité de l'absorption varie avec la concentration de la solution.

Nous avons trouvé le commencement de la bande sombre

Pour une épaisseur	{	de 2 unités de la cuve de Baly, $\lambda = 400,8$	
		de 5 unités	— $\lambda = 404,0$
		de 10 unités	— $\lambda = 420,0$
		de 15 unités	— $\lambda = 428,5$
		de 25 unités	— $\lambda = 490,0$
		de 30 unités	— $\lambda = 520,0$

Si l'on veut comparer les spectres de l'urobiline et de cet urochrome en opérant avec la même concentration, on obtient avec le spectre de l'urobiline des bandes bleues, visibles à leur place habituelle, entre b et F dans la région verte $\lambda = 510$ et $\lambda = 485$. Donc l'urobiline est différente de notre pigment normal au point de vue spectral.

Au contraire, l'urochrome théorique des auteurs donne, comme la matière extractive de FLORENCE, une bande sombre également dans la région violette du spectre.

Une deuxième observation a été faite *avec une solution alcoolique acide* au 1/100^e du pigment, afin d'être ainsi dans des conditions normales d'étude du spectre de l'urobiline.

L'urobiline en solution alcoolique acide donne une bande d'absorption située dans le vert et le bleu cyané. Cette bande est comprise entre λ 510 et λ 485 (ces chiffres sont exprimés en longueur d'onde).

L'urochrome de DOMBROWSKI donne dans ces conditions un spectre différent de l'urobiline. D'après cet auteur [22], il donne une bande d'absorption dans la région violette du spectre, dont la limite serait entre $\lambda\lambda$ 444-442, dans les solutions diluées ; et $\lambda\lambda$ 470-468 dans les solutions concentrées. D'après SCHMITT [95], l'extinction se ferait à partir de λ 472.

L'urochrome obtenu par notre méthode au sulfate d'ammoniaque, en solution alcoolique acide, ne donne aucun des caractères spectraux de l'urobiline citée, mais un spectre à peu de chose près semblable à celui de l'urochrome théorique avec une cuve de petite épaisseur de 1 mm. 01, nous avons trouvé une extinction à partir de $\lambda\lambda$ 436-434.

Avec une cuve de 5 mm. 04, l'extinction commence à $\lambda\lambda$ 448. Ces deux chiffres correspondent aux mesures faites en solutions diluées par DOMBROWSKI ($\lambda\lambda$ 444-442).

Enfin avec une cuve de 10 millimètres, l'extinction s'étend et donne une ombre à partir de $\lambda\lambda = 473-472$, ce qui correspond à une solution concentrée (qui pour DOMBROWSKI donnait $\lambda\lambda$ 470-468).

Une troisième expérience a été faite en ajoutant à la

solution de l'ammoniaque, afin de rendre la solution alcaline.

L'urobiline donne en solution alcoolique ammoniacale, si on a soin d'ajouter une solution de chlorure de zinc au 1/100^e, une bande semblable à celle de la solution alcoolique acide, mais on observe un déplacement de la bande qui se porte vers b et E, c'est-à-dire environ entre λ 500 et λ 517 : cette bande a d'ailleurs une obscurité moins grande que la précédente.

Nous avons ajouté ces réactifs à une solution alcoolique et ammoniacale de notre matière colorante, la bande d'absorption de l'urobiline ne se montre pas, ni aucune fluorescence verte ; il en est de même avec l'urochrome de DOMBROWSKI.

Enfin GARROD [29] a montré que l'urochrome préparé avec le plus haut degré possible de pureté donne, en présence d'aldéhyde acétique, d'ammoniaque et de chlorure de zinc, une bande d'absorption semblable à celle de l'urobiline. Pour GARROD cette réaction permettrait de se rendre compte de l'origine de l'urochrome ainsi que de ses rapports avec les pigments : urobiline et hématine. Elle serait un test de la présence de l'urochrome.

DOMBROWSKI [22] a étudié l'action de l'aldéhyde acétique sur l'urochrome ; il montre qu'il n'a jamais pu obtenir cette réaction, ni par la chaleur, ni par la lumière avec « un aldéhyde dit actif », il pense que cette réaction est donnée par un pigment étranger qui donnerait de l'urobiline sous l'action de ces réactifs.

Nous avons étudié cette réaction sur une solution neutre alcoolique de notre matière colorante. En ajoutant

de l'acétaldéhyde à la solution chaude, ainsi que de l'ammoniaque et du chlorure de zinc, nous n'avons pas observé les raies caractéristiques de l'urobiline.

Donc, en résumé, il semble possible d'après cette étude spectrale, d'identifier spectroscopiquement le pigment extrait par la méthode de A. FLORENCE avec le pigment de DOMBROWSKI : l'urochrome. Ils se différencient de l'urobiline, l'un et l'autre, en ce qu'ils montrent une bande plus foncée du côté des longueurs d'onde faibles, mais non dans la région du vert et du bleu cyané.

CHAPITRE III

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA MATIÈRE COLORANTE

A. — PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

C'est un acide, un corps azoté, un corps soufré.

Le caractère chimique principal de l'urochrome est sa fonction *acide*.

Il rougit le papier de tournesol, il se combine aux bases pour donner des sels ; ainsi avec la chaux, la baryte, il donne des combinaisons qui peuvent servir à son extraction.

Après avoir précipité l'urochrome à l'état de combinaison cuivrique, en présence d'acétate, de même on peut traiter le précipité par l'hydrogène sulfuré, la solution additionnée d'eau de chaux donne un sel de l'urochrome que l'on peut précipiter de sa solution par l'alcool.

Il donne donc des combinaisons avec les métaux et forme ainsi des sels de ces métaux.

Nous avons trouvé ces caractères acides à notre produit d'extraction. Il donne ainsi des sels des métaux alcalins et alcalino-terreux, de même que des sels des autres métaux, cuivre, argent, etc.

Le caractère acide du pigment urinaire normal a été reconnu depuis longtemps, et quoique sa constitution fut longtemps méconnue, ses propriétés acides furent les premières remarquées.

Cependant THUDICHUM [103] le rangeait parmi les corps alcaloïdiques et basiques.

Mais, après les travaux de BONDZYNSKI, GOTTLIEB [9], DOMBROWSKI et de PANECK [8] sur les acides protéiques, un grand nombre de biologistes s'accordent à reconnaître que l'urochrome est un acide azoté et un acide très riche en soufre.

Or, les acides protéiques forment un groupe d'acides organiques très riches en soufre et en azote, provenant de la désassimilation des matières albuminoïdes. Aussi cette similitude de constitution va permettre de faire de l'urochrome un acide de ce groupe et, de ce fait, la constitution et l'origine de ce pigment vont nous être données et on a pu écrire : que « *la découverte des acides protéiques, corps azotés et sulfurés jusque-là méconnus, provenant de la désassimilation des matières albuminoïdes de l'économie, a fait rentrer dans une nouvelle voie la solution du problème délicat concernant la matière fondamentale des urines* ».

L'urochrome est un acide et c'est un acide très riche en azote ; notre produit est comme l'urochrome un corps azoté à poids moléculaire élevé, ce que va montrer l'étude de sa composition élémentaire.

Nous nous sommes rendu compte avant toute analyse quantitative de la présence d'azote dans le produit pigmentaire dont nous faisons l'étude. Un essai préliminaire

nous a donné, avec le procédé de LASSAIGNE, une preuve de l'existence de l'azote dans notre pigment.

Nous avons pris une petite quantité de substance dans un tube à essai avec une trace de sodium, en présence de sulfate ferreux et d'acide chlorhydrique, une coloration bleu de Prusse se forme par suite de l'action de l'azote qui donne du cyanure de sodium.

Nous avons obtenu la belle coloration bleue indiquant la présence d'azote dans notre produit.

L'urochrome est aussi un acide riche en soufre et le fait de la présence de soufre dans le colorant urinaire est d'une grande importance pour la connaissance et de ses origines et de sa constitution.

Nous avons décelé la présence du soufre dans notre pigment par action du sodium, qui donne avec ce métal du sulfure de sodium. En présence de nitro-prussiate de soude, nous avons obtenu une belle coloration violette montrant l'existence du sulfure de sodium formé.

Donc le pigment étudié est comme l'urochrome, un acide azoté et sulfuré.

DOMBROWSKI [22] a étudié dans son principal article sur l'urochrome, la liaison du soufre dans le pigment et MÖRNER [70] a démontré de même l'existence du soufre dans les produits pigmentaires combinés à l'acétate de plomb.

Le fait de la présence du soufre dans le pigment normal de l'urine est de grande importance et, comme l'indique l'article du *Journal de pharmacie et de chimie*, de 1923, « le seul fait de la présence du soufre dans le pigment normal de l'urine démontre que ce corps ne dérive pas de la partie colorée de l'hémoglobine, ni de l'urobiline ».

Pourtant l'existence du soufre dans l'urochrome a été mise en doute par certains auteurs. Aussi, en 1914, DOMBROWSKI [23] affirme-t-il la présence du soufre dans l'urochrome et il lui donne le nom de *thiourochrome*, afin de mettre en évidence, par cette dénomination, le rôle du soufre dans cette molécule complexe.

L'urochrome contient-il du fer ? TICHBORNE [104] indique que le pigment urinaire normal ne contient pas de fer et de même DOMBROWSKI [23] recherche le fer dans l'urochrome.

Il a traité la combinaison cuivrique de l'urochrome avec de l'acide sulfurique concentré, puis après avoir oxydé le mélange avec de l'acide nitrique, il a porté le tout à l'ébullition et n'a jamais pu obtenir de réactions des sels de fer dans le liquide.

Nous n'avons pas trouvé de réactions du fer dans le produit étudié et l'absence du fer, comme la présence du soufre, permet d'éliminer les rapports entre notre pigment et celui du sang.

Donc, d'après ces essais préliminaires de l'urochrome et ceux des pigments obtenus par la méthode de A. FLORENCE, il nous semble prouvé que notre pigment urinaire et le pigment normal l'urochrome sont des acides azotés et sulfurés ne contenant pas de fer.

Nous allons maintenant en faire l'étude quantitative élémentaire et essayer de montrer à quel groupe il appartient, et par quel mécanisme il s'est formé, afin de se rendre compte du rôle qu'il peut jouer dans le métabolisme des substances protéiques dont il dérive probablement, comme nous essayerons de le démontrer.

B. — ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

Dosage du carbone. Dosage de l'hydrogène. Dosage du soufre.

L'analyse des éléments simples constitutifs de cette substance est difficile, vue la difficulté que l'on éprouve à obtenir un produit pur.

En effet, ces matières colorantes sont amorphes et très hygroscopiques et A. FLORENCE écrivait que par sa méthode il a pu isoler des pigments « à un état aussi voisin de la pureté que peuvent le permettre des substances incristallisables ». D'autre part, les corps obtenus sont très hygroscopiques et nécessitent et pour leur pesée et pour leur conservation, des précautions nombreuses, afin d'éviter les erreurs apportées par l'eau de l'atmosphère.

Une autre cause d'erreur dans l'analyse élémentaire de cette substance est la difficulté que l'on éprouve à la priver des corps azotés comme l'urée et le sulfate d'ammoniaque.

Nous avons employé de l'alcool strictement absolu afin d'avoir le minimum d'eau que le pigment peut contenir. Une trace d'eau dans la reprise du résidu par l'alcool dissout encore du sulfate d'ammoniaque et apporte et du soufre et de l'azote en excès.

Nous avons renouvelé plusieurs fois les lavages à l'alcool. Filtration et évaporation des dosages successifs d'azote après ces traitements, nous ont montré que la purification se faisait peu à peu. Nous avons complété cette purification par l'alcool en précipitant le pigment par l'éther qui semble avoir pour effet d'éliminer encore des impuretés.

Avant la série de lavages, nous avions 23 % d'azote, après lavage à l'alcool la proportion est passée de 23 % à 20 %, enfin le dosage après la purification à l'éther ne donnait plus que 15 %.

Nous avons recherché sur notre produit colorant les caractères de pureté, particulièrement l'absence d'urée et de sulfate d'ammoniaque.

Après tous les traitements précédents nous n'avons pas trouvé en solution alcoolique acidifiée par l'acide acétique de précipité de xanthylurée, ce qui élimine la présence d'urée.

Le produit en solution aqueuse dans une eau distillée ne donne pas de précipité avec le chlorure de baryum, ce qui indique que le sulfate d'ammoniaque a été entièrement enlevé.

Nous avons considéré la matière colorante comme pure et nous en avons fait l'analyse élémentaire en comparant les résultats obtenus avec ceux donnés par les auteurs dans l'analyse de l'urochrome.

Les résultats des analyses assignent à l'urochrome la constitution suivante, d'après :

	Dombrowski [22]	Salomonsen [92]	Mancini [63]	Verne [107]
C....	43,09	40,4	32,12	43,42
H....	5,14	4,8	3,8	5,3
N....	11,5	9,0	8,10	10,78
S....	5,09	»	»	5,89
O....	35,55	»	14,88	34,38

La quantité de carbone varie de 32 grammes à 43 gr. 42. Ces divergences dans les chiffres donnés par

l'analyse élémentaire proviennent du fait que le corps n'est pas cristallisé et les diverses méthodes d'extractions ont fourni un produit sensiblement voisin mais non identique. Pourtant ces résultats sont si rapprochés que l'eurochrome de DOMBROWSKI et celui de SALOMONSEN semblent un même produit.

Il en est de même du pigment dont nous faisons l'étude.

Dosage du carbone et de l'hydrogène.

Après avoir par l'analyse élémentaire qualitative montré la présence de C. H. N. S. dans la matière extractive colorante, nous en avons fait l'analyse élémentaire quantitative.

Nous avons fait le dosage du *carbone et de l'hydrogène* par la méthode classique de combustion en présence d'oxyde de cuivre. Cette méthode consiste à chauffer la substance organique avec de l'oxyde de cuivre. Il rompt les liaisons avec le carbone et transforme totalement le carbone en anhydride carbonique et l'hydrogène en eau. L'eau est absorbée par la ponce sulfurique renfermée dans un tube en U. L'augmentation de poids de ce tube après la combustion correspond à la quantité d'eau produite : on en déduit l'hydrogène qui s'est produit.

Le gaz carbonique est condensé dans une solution aqueuse concentrée de potasse caustique contenue dans **un** tube de LIEBIG et par de la potasse caustique fondue renfermée dans un tube en U. On détermine d'après l'augmentation de poids de ces deux tubes, après l'expérience, la quantité de gaz carbonique formé et par suite la quantité de carbone du produit.

Il serait trop long de décrire la méthode dans ses détails, elle est entièrement décrite dans « le Précis d'analyse quantitative » d'un de nos maîtres de cette Faculté, M. le Professeur BARRAL [1].

Qu'il suffise d'indiquer la précaution que nous avons dû prendre, étant donnée la présence de soufre dans le produit analysé, pour éviter la formation d'anhydride sulfureux absorbable par la potasse. Nous avons placé dans la partie antérieure du tube de la toile métallique de cuivre roulée, cuivre réduit au préalable. Il décompose les oxydes d'azote qui pourraient se former et qui, étant absorbés par la potasse, donneraient un poids inexact pour l'anhydride carbonique.

Nous avons opéré sur une prise d'essai de 0 gr. 2841. *La quantité d'hydrogène contenue dans 100 grammes de notre produit a été de 5 gr. 21* (on obtient le poids d'hydrogène en divisant par 9 le poids de l'eau fixée par l'acide sulfurique).

Le tube de LIEBIG et le tube de potasse fondue ont augmenté en total de 0 gr. 4600, le poids du carbone est obtenu en multipliant par 3,11 ce résultat.

La quantité de carbone contenu dans 100 grammes de notre produit a été de 43 gr. 9.

Or les résultats du dosage du carbone et de l'hydrogène de DOMBROWSKI sont très voisins, puisqu'il trouve respectivement 5 gr. 14 d'hydrogène et 43 gr. 09 de carbone.

De même l'urochrome de Verne contient 5 gr. 3 d'hydrogène et 43 gr. 42 de carbone.

Il nous semble dès maintenant permis de rapprocher

nos résultats des chiffres théoriques des auteurs et de voir dans notre substance amorphe un produit semblable à l'urochrome.

Dosage du soufre.

Le dosage du soufre, dans cette molécule complexe qu'est le pigment urinaire, va nous apporter une nouvelle preuve à l'appui de notre rapprochement de ces deux pigments.

Nous avons dosé le soufre à l'état de sulfate de baryum, mais comme le soufre est masqué vis-à-vis de ses réactifs dans les composés organiques, une minéralisation fut nécessaire.

Nous avons rompu les liaisons du soufre dans cette matière par deux méthodes. Une première, au rouge, par un mélange de carbonate et de nitrate alcalin qui donne le soufre à l'état de sulfate ; une deuxième par oxydation sous l'action de l'acide sulfurique, chauffé en tube scellé, qui donne de l'acide sulfurique.

La première méthode au moyen du nitrate de potasse et de carbonate de potasse nous a donné, après chauffage au rouge dans un creuset de platine, une destruction complète de la matière organique. 0 gr. 493 de produit ont, après oxydation, fourni un produit soluble dans l'eau. Nous y avons précipité le soufre à l'ébullition à l'état de sulfate de baryum.

Nous avons trouvé avec cette méthode la proportion de *6 gr. 6 de soufre pour 100 grammes de produit.*

La deuxième méthode de destruction de la substance organique que nous avons employée, est la méthode de

CARIUS. Quoique dangereuse à appliquer, elle nous a semblé plus précise que la précédente.

Nous avons chauffé pour cela 0 gr. 31 de substance avec de l'acide azotique de densité 1,39, dans un tube scellé placé dans un étui de fer, au bain-marie d'huile horizontale de WÜRTZ.

Ayant observé que notre substance d'étude était facilement détruite, nous nous sommes contenté de chauffer à 190° et 200° durant une heure. Le liquide ainsi obtenu nous a donné après traitement par le chlorure de baryum un précipité que nous avons traité suivant la technique courante. Notre prise d'essai nous a donné un précipité de 0 gr. 025 de *sulfate de baryte*, soit une proportion de soufre pour 100 grammes de pigment de 6 gr. 4.

DOMBROWSKI a trouvé dans l'urochrome une quantité de 5 gr. 09 de soufre, VERNE de 5 gr. 89 de soufre. Nous avons trouvé 6 gr. 4 dans cette dernière analyse.

Notre produit d'extraction est donc un produit soufré comme la « *thiourochrome* » de DOMBROWSKI. Il contient cet élément dans le même ordre de grandeur que l'urochrome théorique.

Dosage de l'azote.

Enfin le dosage de l'azote vient compléter cette analyse élémentaire. Nous l'avons fait au moyen de deux méthodes :

Une microméthode à l'aide de l'appareil de Parnas et Wagner nous a permis, par une série de dosages successifs, de nous rendre compte du degré de pureté de notre pigment.

Un dosage par la méthode de DUMAS nous a apporté des données précises sur la teneur en azote de l'urochrome.

Le principe de la méthode DUMAS est basé sur les propriétés que possède l'oxyde de cuivre de donner au rouge, en présence d'une matière organique, du gaz carbonique, de l'eau et de l'azote (ou l'un de ces oxydes). Le cuivre réduit décompose les oxydes d'azote à l'état d'azote libre, le gaz carbonique est absorbé par la potasse, l'eau se condense et l'azote se dégage dans un appareil où l'on mesure son volume.

Nous avons opéré avec l'appareil à combustion de DUMAS, muni d'une trompe à vide ; l'azote se dégageait dans un appareil de DUPRÉ modifié par BENDER et HOBLIN où le tube de dégagement est gradué, ce qui permet facilement la lecture.

Nous avons trouvé, grâce à cette méthode, la proportion de *12 gr. 27 d'azote pour 100 grammes d'urochrome*. Cette quantité est relativement très voisine de celle trouvée dans l'urochrome par DOMBROWSKI.

Nous représentons dans le tableau suivant la composi-

tion élémentaire de l'urochrome étudié par les auteurs et par nous :

	Dombrowski	Verné	Urochrome étudié	Urobiline
C....	43,09	43,42	43,9	63,58
H....	5,14	5,3	5,21	7,84
N....	11,15	10,78	12,27	4,11
S....	5,09	5,89	6,48	Néant.
O....	35,53	34,58	32,14	24,47

Ce tableau permet de se rendre compte de la différence de constitution centésimale de l'urochrome et de l'urobiline et du rapprochement que l'on peut faire de notre substance obtenue par la méthode de A. FLORENCE avec le pigment normal urinaire. Etant donné que nous avons dans toutes les extractions une substance non cristallisée, la faible différence de proportion des éléments constitutifs des pigments entre eux s'explique forcément et il ne nous semble pas téméraire d'identifier notre matière colorante avec l'urochrome.

Le dosage de l'azote de l'urochrome comporte, comme nous l'avons fait, l'azote total, c'est-à-dire l'azote ammoniacal et l'azote aminé que peut contenir l'urochrome.

En effet, DOMBROWSKI et BROWINSKI étudièrent en 1912 [23] l'azote des acides oxyprotéiques de l'urine humaine et en particulier la teneur en azote aminé de l'urochrome et il ressort de leurs travaux que les acides oxyprotéiques et l'urochrome donnent, après hydrolyse, des acides aminés.

L'hydrolyse a été faite par ces auteurs au moyen de deux méthodes différentes, l'une avec l'acide chlorhydrique, l'autre avec l'acide fluorhydrique d'après la mé-

thode de M. MOREL et HUGOUNENQ [69 bis], le dosage des groupements NH^2 par la méthode de SÖRENSEN.

L'ammoniaque est au préalable éliminée par distillation avec la magnésie calcinée sous pression ordinaire : elle doit être entièrement entraînée.

On procède alors à l'hydrolyse de la solution d'urochrome, au moyen de l'acide chlorhydrique, dans un appareil muni d'un réfrigérant. On filtre le liquide d'hydrolyse et on le sépare en trois parties. L'une servira au dosage de l'azote total, l'autre au dosage de l'azote ammoniacal, la troisième partie au dosage de l'azote aminé.

DOMBROWSKI, comparant la fixation de l'azote sur l'urochrome, les acides alloxyprotéiques et les acides oxyprotéiques, résume ses analyses en disant que l'azote des acides oxyprotéiques et antoxyprotéiques est en majeure partie sous forme d'azote aminé de (38,8 % et 11,2 % par rapport à l'azote total).

Au contraire, l'urochrome et l'acide alloxyprotéique renferment respectivement 2,4 et 6,4 % d'azote aminé par rapport à l'azote total.

La présence de groupes aminés, pouvant être titrés par le formol, permet de montrer les rapports étroits qui existent entre l'urochrome et les acides oxyprotéiques de l'urine, mais la présence d'azote aminé en grande quantité (38,8 et 11,2 %) et à l'état libre dans ces derniers semblent montrer qu'ils correspondent à une dégradation plus complète de la molécule albuminoïde.

Nous avons fait une hydrolyse au moyen de l'acide chlorhydrique, qui nous a montré l'existence d'azote titrable par le formol, c'est-à-dire la présence d'azote aminé dans notre urochrome.

CHAPITRE IV

THÉORIE SUR LA CONSTITUTION PROBABLE DU PIGMENT NORMAL URINAIRE

A. — C'EST UN CORPS VOISIN DES ACIDES OXYPROTÉIQUES.

Etant données les réactions acides de l'urochrome ainsi que sa constitution azotée et sulfurée, nous allons essayer, d'après les connaissances actuelles de sa constitution, de montrer que ce corps est voisin des acides oxyprotéiques.

La recherche du groupe chimique auquel se rattache l'urochrome (et par suite notre matière colorante) est un problème qui a intéressé de nombreux biologistes.

En effet, il n'est pas de travaux sur les matières colorantes de l'urine où la question de leur constitution, de leur origine n'ait été étudiée.

Il serait trop long et inutile de revenir sur les conceptions des anciens auteurs à ce sujet. « Le *purpurate d'ammoniaque* » de PROUST, « l'*acide rosacique* » de VAUQUELIN, « l'*urhodine* » de HELLER, « la *matière colorante* » de SCHERER, etc..., sont des complexes chimi-

ques, peut-être des mélanges de produits de décomposition des pigments eux-mêmes dont la constitution ne peut être que difficilement élucidée.

Il faut arriver aux récents travaux, datant de 1902, sur les acides protéiques de l'urine pour comprendre la constitution du pigment urinaire normal.

C'est en 1897 que BONDZYNSKI et GOTTLIEB [9] découvrent dans l'urine des acides azotés et sulfurés à poids moléculaire élevé provenant de la désassimilation des matières protéiques.

En 1902, BONDZYNSKI et PANECK [10] étudient la partie alloxyprotéique des urines normales.

Ces études vont avoir une importance capitale pour la connaissance des pigments urinaires. En effet, c'est le rapprochement des principes colorants de l'urine avec les acides azotés et sulfurés de l'urine par BONDZYNSKI, DOMBROWSKI et PANECK [8] qui fait rentrer ce problème chimico-biologique dans une nouvelle direction, et, par le fait, la constitution même des pigments est établie.

Le pigment urinaire fait partie des acides alloxyprotéiques de l'urine.

On a découvert ainsi qu'il existait dans d'urine des corps azotés et sulfurés, à qui on a donné le nom d'acide *oxyprotéique*, *alloxyprotéique*, *antoxyprotéique*.

Ces acides donnent avec la baryte et la chaux des sels de calcium et de baryum, dont la solution traitée par l'acétate de mercure donne une substance brune sulfurée qui se rapproche beaucoup de l'urochrome et par sa constitution, et par sa propriété de se combiner à l'acétate de cuivre. De là à faire de ce corps sulfuré l'urochrome lui-même, il n'y avait qu'un pas.

En effet, DOMBROWSKI et ses collaborateurs montrent que l'urochrome peut être extrait de l'urine en compagnie des acides alloxyprotéiques dont on l'isole ensuite.

Ils opèrent ainsi : on fait des sels de chaux ou de baryte des acides oxyprotéiques ; on les traite par le sous-acétate de plomb et le nitrate mercurique. Après neutralisation par l'acide acétique, l'acétate de cuivre donne une combinaison verdâtre avec l'urochrome qui est lavée successivement et par l'éther et par l'alcool. On transforme alors le sel cuivrique d'urochrome en sel d'argent ou de baryum.

DOMBROWSKI en 1908 [22], par des recherches plus complètes à partir des sels de calcium et de baryum des acides protéiques de l'urine, démontre (par le dosage du soufre dans la combinaison mercurielle puis cuivrique) la présence de la substance soufrée décrite par TICHBORNE et étudiée par GARROD, c'est-à-dire l'urochrome.

Il étudie dans la purification des acides alloxyprotéiques de l'urine la partie colorée. Il fait absorber ces acides par le noir animal et isole l'urochrome par l'acétate de cuivre ; il fait l'analyse élémentaire de la combinaison cuivrique et il en déduit que l'urochrome fait partie des acides alloxyprotéiques de l'urine.

Donc l'urochrome de DOMBROWSKI est un corps riche en azote et en soufre, il va rentrer parmi les produits de la désassimilation des matières protéiques et sa fonction d'acide protéique va pouvoir expliquer et son origine et ses variations dans l'urine.

Les travaux de LIEBERMANN [56] viennent discuter cette origine.

Depuis ces découvertes, de nombreux auteurs rattachent la matière colorante des urines au groupe des acides oxyprotéiques, il en est ainsi de WEISZ [111] qui donne un schéma de la dérivation de l'urochrome des acides protéiques.

De même BOCCII et GHEFI [6] identifient la substance isolée par les sels de baryte dans une urine avec l'urochrome, ainsi qu'OLIARI [81] qui l'appelle « *l'acide chromoxyprotéique* ».

Et M. HUGOUNENQ [44] résume la question lorsqu'il dit :
« *C'est probablement un acide azoté et sulfuré, voisin des acides protéiques à poids moléculaire élevé ou plutôt un polypeptide riche en cystine et composés aromatiques.* »

B. — LA RÉACTION D'EHRlich ET L'UROCHROME.

Les travaux d'EHRlich, en 1882, ont permis de trouver une réaction spécifique des corps aromatiques dans l'urine ; c'est la réaction dite d'EHRlich. Nous avons cherché si l'urochrome donnait cette coloration, ce qui nous permettrait de présumer d'une façon plus précise sa constitution.

Le principe de la réaction est le suivant : les amines dérivées des phénols, les anilines, donnent des corps diazoïques quand on les traite par l'acide nitreux et, en présence d'une amine ou d'un phénol, on obtient un azoïque très coloré après alcalinisation.

Le réactif employé est formé de deux solutions : l'une une solution chlorhydrique d'acide sulfanilique, c'est la solution A ; l'autre une solution aqueuse de nitrite de potassium, c'est la solution B.

On opère sur l'urine fraîche (si on veut étudier cette réaction dans ce liquide) après avoir ajouter partie égale du réactif A et cinq gouttes de réactif B ; on alcalinise légèrement avec l'ammoniaque. On observe une coloration rouge caractéristique.

On peut faire cette réaction à partir du pigment pur, soit en solution alcoolique, soit en solution aqueuse, en opérant comme précédemment.

OLIARI, en 1908 [81], attribue la diazoréaction d'EHRlich des urines des malades atteints de pneumonie, de choléra infantile, de tuberculose, à l'augmentation de l'urochrome dans l'urine.

Bocchi et Ghelfi [6], la même année, écrivent que l'urochrome donne une réaction d'EHRlich très positive.

Weisz [111], dans plusieurs communications en 1907, 1911 et 1920, recherche la réaction d'EHRlich dans la fraction alloxyprotéique de l'urine ; la diazoréaction est donnée par deux chromogènes qui viennent des acides antoxy et alloxyprotéiques. Il extrait de l'urine deux chromogènes α et β qui, sous l'influence d'une oxydation, donnent un corps diazoréactionnant. L'urochrome contiendrait donc un groupement hydroxyle en position ortho.

Il conclut qu'il y a un rapport étroit entre la destruction des matières albuminoïdes des tissus, l'excrétion des acides protéiques et par suite l'élimination de l'urochrome.

Gur, en 1923 [34], étudie la diazoréaction d'EHRlich dans l'urine ; il fractionne pour cela l'urine afin d'obtenir un corps qui réagit d'une façon très nette sur l'acide diazobenzène sulfonique. Il obtient un corps diazoréactionnant ayant toutes les réactions de la thio-urochrome de Dombrowski et par suite de l'urôchrome de notre étude.

Et les conclusions de Gur sont les suivantes, la diazoréaction d'EHRlich est donnée :

- 1° Par l'urochrome ou un corps donnant les mêmes réactions que la thio-urochrome ;
- 2° Par un corps plus oxydé que l'urochrome ;
- 3° Par les sels alcalins terreux de l'urochrome.

Nous avons recherché la réaction d'EHRlich sur notre produit d'étude. Nous avons opéré sur une solution

aqueuse de notre pigment, nous avons obtenu la belle coloration rouge avec l'acide sulfanilique, ce qui nous a montré, une fois de plus, les caractères voisins de notre matière colorante et du colorant urinaire normal.

La constatation de la diazoréaction d'EHRlich dans l'urochrome a une grande importance au sujet des connaissances de l'origine des pigments urinaires ; le fait qu'il contient des corps aromatiques fait penser à l'existence, dans sa molécule d'un noyau cyclique, et LAMBLING [51] résume cette conception lorsqu'il écrit, en parlant de l'urochrome.

« Il contient donc un noyau cyclique, peut-être de l'histidine, puisque la diazoréaction d'Ehrlich est caractéristique de ce corps renfermant ce complexe. On a donc quelques raisons de rechercher dans quelques protéines l'origine de ce pigment. »

(C) — ÉTUDE DU PYRROL DONNÉ PAR L'UROCHROME.

L'urochrome donne par distillation sèche un pyrrol, propriété qui, avec la réaction d'EHRICH, permet de connaître, semble-t-il, d'une façon plus précise l'origine et la genèse du pigment urinaire normal.

Nous avons étudié la distillation sèche de l'urochrome d'après les auteurs et ses rapports avec la distillation des dérivés de l'hématine ainsi que les réactions du pyrrol obtenu avec notre produit d'extraction. Ceci dans un double but :

D'une part, si nous trouvons les réactions du pyrrol dans la distillation de notre substance, nous montrerons, par cette réaction, sa similitude avec l'urochrome de DOMBROWSKI.

D'autre part, si le pyrrol obtenu est, comme celui obtenu par cet auteur, différent de l'hémopyrrol, nous prouverons que ce corps n'a rien de commun avec l'oxy-hémoglobine.

Pendant longtemps les biologistes ont établi des rapports étroits entre l'urochrome et les pigments sanguins, qu'il suffise de se reporter aux travaux de MALY [62], de GARROD [29], de KLEMPERER [48], pour se rendre compte de cette tendance. GARROD traite l'urochrome par l'aldéhyde acétique, il trouve le spectre de l'urobiline. Inversement l'urobiline, oxydée par le permanganate de potasse, donnerait de l'urochrome.

Mais DOMBROWSKI [22] distingue l'urobiline de l'urochrome par le pyrrol qu'ils donnent. On peut résumer ainsi sa théorie :

Si on distille avec le zinc en poudre l'urochrome, il donne un pyrrol différent de l'hémopyrrol.

Le composé pyrrolique se comporte avec les composés diazoïques comme le pyrrol lui-même.

Le spectre d'absorption du produit obtenu est identique à celui du pyrrol ordinaire.

Nous avons fait une distillation sèche de notre matière colorante en employant le dispositif indiqué par GUR [34] dans sa thèse. L'appareillage est le suivant :

Un tube de verre, fermé à son extrémité, est soudé à un autre tube de diamètre inférieur coudé en U. Dans la branche coudée en U, on a soufflé trois boules pour recueillir les produits de la distillation. L'appareil est mis en communication avec une trompe à vide et le tube réfrigérant est placé dans un mélange de glace et de sel.

On place la substance dans le tube avec un tampon d'amianté et on chauffe ce tube. Il se produit quelques gouttes d'eau et quelques gouttes huileuses qui se déposent dans les boules de verre. On sectionne après refroidissement le tube et on épuise par l'éther le distillat sur lequel on fait les réactions du pyrrol.

Nous avons évaporé la solution étherée : une partie traitée par l'acide chlorhydrique donne une coloration violette, mais aucune fluorescence avec le chlorure de zinc ; une autre partie évaporée donne des vapeurs rougissant les copeaux de sapin.

Ces réactions sont celles du pyrrol ordinaire.

DOMBROWSKI montre que l'urochrome donne un pyrrol qui diffère de celui des corps étudiés par NENCKI et ZALESKI [77], ainsi que de ceux étudiés par Otto FISHER et

HEPP [26]. Ce pyrrol n'a aucun rapport avec l'hémopyrrol, ce qui le distingue du noyau de l'hémine et de l'urobiline.

Les conditions dans lesquelles se forme le composé diazoïque du pyrrol urochromique, comparées à celles du diazohémopyrrol étudié par MARCHLENSKI [66] et ses collaborateurs n'ont pas montré à ces auteurs l'existence de l'hémopyrrol dans l'urochrome distillé à sec.

On a montré, ces derniers temps, que l'urochrome contient dans sa molécule le même pyrrol dont SCHULTZENBERGER [97] avait constaté l'existence dans les molécules des matières protéiques en traitant ces substances avec de la baryte à une température de 150°.

C'est aussi le pyrrol identique à celui de MALY [62] obtenu par oxydation des matières protéiques dans les acides oxyprotéiques.

Donc l'étude du pyrrol obtenu à partir de l'urochrome différencie ce pigment de l'urobiline et permet de se rendre compte de l'origine albuminoïde du pigment normal.

D. — MÉLANINES DONNÉES PAR L'UROCHROME

La troisième propriété intéressant la constitution de l'urochrome est le fait qu'il donne, sous l'action de certains réactifs, des mélanines.

Nous avons, au sujet de l'action des réactifs : chaleur, acides divers, montré précédemment que l'urochrome donne des produits noirâtres d'aspect résineux auxquels on donne le nom d'*uromélanine*.

Traité à chaud par l'acide chlorhydrique, en particulier, l'urochrome donne un produit brun-noirâtre étudié par DOMBROWSKI [23].

Nous avons obtenu de même par l'action et de la chaleur et des acides, un corps présentant comme celui de DOMBROWSKI des caractères physico-chimiques qui le rapprochent de l'*uromélanine* de cet auteur.

Nous avons opéré suivant sa méthode :

Une quantité d'urochrome donnée est mise en solution dans l'eau avec environ 10 % d'acide chlorhydrique. Le tout est porté à l'ébullition pendant cinq à dix minutes. Quand la température s'élève, la masse se fonce, devient noire et prend l'aspect d'un goudron épais. Le liquide est filtré, lavé et à l'éther et à l'alcool. Le produit est dissous dans l'ammoniaque et neutralisé avec de l'acide chlorhydrique.

Nous avons essayé sur ce produit les caractères de solubilité donnés par DOMBROWSKI lui-même et nous avons trouvé, comme lui, que notre uromélanine foncée était insoluble dans l'eau, l'alcool, l'éther, elle est soluble dans l'ammoniaque.

Cette substance ressemble beaucoup à la « *substance noire* » de PROUST, ainsi qu'à l'*uromélanine* de THUDICHUM. Il en donne la formule suivante : $C_{36} H_{43} N_7 O_{10}$.

DOMBROWSKI en étudie la constitution élémentaire et donne de l'*uromélanine* la formule $C_{47} H_{44} N_7 SO_{13}$. Elle lui permet de rapprocher cette substance noire des mélanines naturelles de certains tissus pigmentés d'une part ; et des mélanines des tumeurs appelées phymatorhisme éliminées par l'économie dans l'urine en cas de sarcomes mélaniques d'autre part. Enfin, il les trouve voisines de la substance chromogène obtenue par NENCKI [74] dans le produit d'hydrolyse des matières protéiques par les acides.

En effet, DOMBROWSKI rapproche l'*uromélanine* des pigments qui colorent les tissus, l'épiderme, la pie-mère, le noir de sèche, etc., quoique l'*uromélanine* paraisse avoir un processus de formation différente.

Le pigment mélanique qui colore l'urine en noir après exposition de ce liquide à l'air, ce même colorant qui imprègne les tumeurs dites « mélaniques », a pour DOMBROWSKI une origine identique à celle de l'urochrome. Cette origine se trouverait dans la désintégration des protéines.

Enfin l'*uromélanine* se rapproche des produits d'hydrolyse des protéines étudiées par NENCKI [74]. Ce sont des substances chromogènes qui proviennent de la destruction de la molécule protéinique avec formation des substances colorées. Ces matières colorantes ont été étudiées par MÜLDER [73], SCHMIEDEBERG [94], CHITTENDERS et ALBRO [13], NENCKI [74], HOPKINS et COLE [41], KURAJEW [50],

DOMBROWSKI [23], comparant la constitution élémentaire du produit violet d'hydrolyse des protéines avec l'uromélanine, donne les résultats suivants :

Substances de NENCKI : $\dot{C} = 59,8$ $H = 4,5$ $N = 10$
 $S = 2,8$.

Substances de DOMBROWSKI : $C = 59,16$ $H = 4,96$
 $N = 9,69$ $S = 3,55$.

Ils lui permettent de rapprocher ainsi ces pigments entre eux et il a pu écrire dans le compte rendu de l'Académie des Sciences : « *La présence dans les urines normales d'une matière colorée, soufrée et le pigment mélanique qui en dérive, doivent actuellement attirer l'attention sur ce groupe de chromogène de la molécule albuminoïde (existant à côté de l'acide scatolamino acétique de HOPKINS et COLE), dans lequel M. NENCKI voyait les matériaux de structure des pigments mélaniques qu'il considérait déjà comme dérivant des transformations des matières albuminoïdes* ».

CHAPITRE V

RÉSUMÉ — CONCLUSION

A. — SIMILITUDE DU PIGMENT DE A. FLORENCE AVEC L'UROCHROME

D'après l'étude faite sur la matière colorante extraite de l'urine par la méthode de A. FLORENCE, il nous semble possible d'affirmer que ce pigment n'est autre que de l'urochrome. Notre matière d'étude, en effet, semble offrir tant de similitude avec le pigment jaune auquel THUDICHUM et GARROD ont donné le nom d'urochrome et dont l'étude a été faite par DOMBROWSKI ces dernières années, que nous faisons de notre pigment d'extraction de l'urochrome.

En effet, en résumant les propriétés, nous trouvons que :

L'urochrome comme le pigment extrait est un corps acide azoté et sulfuré à composition élémentaire voisine.

Ils possèdent des réactions de précipitations, de colorations qui leur sont communes.

L'absence de raies d'absorption du spectre se trouve pour chacun d'eux.

Ils donnent tous les deux par distillation un pyrrol différent de l'hémapyrrol.

La diazoréaction d'EHRlich montre en eux l'existence de corps aromatiques.

L'action des acides à l'ébullition donne à partir de ces matières colorantes des mélanines à propriétés semblables.

Mais ces deux pigments identiques entre eux sont différents de l'urobiline, avec lequel on les avait longtemps confondus.

L'urochrome n'est pas précipité par le sulfate d'ammoniaque, alors que l'urobiline l'est.

L'urochrome est insoluble dans l'éther, le chloroforme, la benzine ; l'urobiline est soluble dans ces solvants.

L'urochrome ne donne rien vis-à-vis du spectre, l'urobiline de JAFFÉ présente une bande stable située entre b et F qui varie avec les réactifs.

Le chlorure de zinc et l'ammoniaque donnent une belle fluorescence verte avec l'urobiline, alors que ce réactif ne donne rien avec l'urochrome.

Le noyau d'où dérivent ces deux pigments est différent : la présence du noyau pyrrolique et non hémopyrrolique, le pigment mélanique qui en dérive, l'existence du soufre dans la molécule démontrent l'origine différente de ces matières colorantes normales de l'urine.

Nous allons essayer de résumer l'état actuel des théories sur l'origine du pigment urinaire normal d'après les connaissances de ces matières colorantes, mais une étude des variations quantitatives de l'urochrome, au préalable, permettra encore des données plus précises à ce sujet.

B. — VARIATIONS DE LA QUANTITÉ D'UROCHROME ÉLIMINÉ

Un grand nombre de méthodes d'extraction de l'urochrome ont permis son étude, mais les procédés de dosages pour la pratique courante sont en petit nombre. La méthode de DOMBROWSKI, de GARROD, celle qui a fait le sujet de cette étude, ne peuvent être employées journellement en clinique pour étudier la variation de l'élimination de l'urochrome. Nous n'avons pas d'ailleurs cherché à faire de notre méthode une méthode de dosage pouvant être employée rapidement ; elle représente, comme celle de DOMBROWSKI surtout, une méthode d'extraction.

Nous n'avons pas étudié les variations quantitatives du pigment normal, mais nous résumerons ici les résultats des auteurs à ce sujet.

Les procédés de dosages pratiques employés en clinique sont basés sur des méthodes colorimétriques qui, tout en n'apportant qu'une certitude relative, permettent malgré cela de se rendre compte des variations quantitatives du pigment normal. On peut se reporter aux méthodes colorimétriques de WEISZ [111], HELLER [38], VOGEL [79], GAUTHIER [30], KLEMPERER [48].

Ces méthodes comparatives n'ont pas l'exactitude que l'on est habitué à voir dans des analyses chimiques.

On a opéré sur des sujets sains et l'élimination de l'urochrome en 24 heures, varie entre 0 gr. 08 à 0 gr. 74. D'après DOMBROWSKI et BROWINSKY [11], la quantité éliminée est de 0 gr. 50 chez un individu normal ; pour

PRATT [85], elle varie de 0 gr. 08 à 0 gr. 14 ; d'après MARISCHLER [67], le taux normal est de 0 gr. 37 ; d'après KLEMPERER [48], 0 gr. 15 et GARROD trouve que l'élimination normale est entre 0 gr. 15 et 0 gr. 40.

La quantité d'urochrome chez un sujet sain, avec un régime mixte, varie entre 0 gr. 05 à 0 gr. 74 par jour environ. Elle semble constante pour un individu déterminé, les chiffres différant d'un sujet à l'autre, mais ne s'éloignant pas trop du sujet moyen, soit environ chez ce dernier 0 gr. 50 par jour.

VEISZ [111] montre que la quantité d'urochrome est plus élevée chez les sujets jeunes que chez les sujets âgés ou convalescents.

La nature de l'alimentation influe sur la quantité d'urochrome excrétée. GUR [34] montre que la quantité d'urochrome augmente avec un régime carné et diminue avec un régime lacto-végétarien.

Cette constatation est en rapport avec la conception actuelle de l'origine albuminoïde du pigment urinaire que nous résumerons à la fin de ce travail. En effet, s'il provient du métabolisme des matières protéiques, il est naturel de voir son augmentation parallèle à celle des acides protéiques. Dans un régime lacté, l'azote total, le bilan azoté est constant mais la quantité d'azote urochromique diminue. La cause de ce phénomène est que la molécule albuminoïde fournit les matériaux nécessaires à la formation des pigments soufrés, pigments mélaniques et urochrome et que cette molécule albuminoïde est vraiment leur point de départ.

L'anesthésie par le chloroforme augmente la quantité d'urochrome ainsi que le jeûne, les rayons X, d'après

WEISZ. La quantité d'urochrome diminuerait sous l'influence des alcalins, augmenterait avec les acides, avec l'adrénaline, la florhazine.

L'ablation des glandes thyroïdes diminuerait le taux d'urochrome, alors que l'on note une augmentation par injection de thyroxine d'après DRAKLIN [24]. Ce dernier auteur a étudié la relation entre le métabolisme de base et l'excrétion du pigment urinaire normal. Il a montré que la variation du pigment urinaire suit l'augmentation du métabolisme et elle est particulièrement élevée dans le goitre exophtalmique.

L'excrétion de l'urochrome est en rapport avec l'état pathologique. Au cours de maladies fébriles, apparaît une augmentation de l'urochrome dans l'urine. Elle est très sensible dans la rougeole, la tuberculose, la néphrite (on a trouvé dans ce cas des quantités variant entre 0 gr. 80 à 2 gr. 7 d'après KLEMPERER), la pneumonie (où le taux peut atteindre 0 gr. 68 à 1 gr. 06 d'après DOMBROWSKI), dans la fièvre typhoïde où l'augmentation est d'autant plus grande que le malade est à un régime strictement maigre.

On a trouvé une augmentation dans le diabète insipide, la pleurésie (0 gr. 86, 0 gr. 77), le typhus (cas étudiés par DOMBROWSKI [22] qui obtient 0 gr. 80, 1 gr. 03, 0 gr. 76, 1 gr. 05. Enfin, dans la cirrhose hépatique, cette variation est très sensible, surtout si on compare l'azote total alimentaire très abaissé et l'azote de l'urochrome sensiblement augmenté.

Donc la quantité d'urochrome excrété est en rapport avec l'âge, l'alimentation, l'état pathologique du sujet.

C — ORIGINE PROBABLE DE L'UROCHROME

LAMBLING [51], étudiant les pigments d'origine protéiques, écrit en parlant de l'urochrome : « *Ce corps contient donc un noyau cyclique, peut-être de l'histidine, puisque la diazoréaction d'EHRICH est caractéristique de ce corps renfermant ce complexe, et on a donc quelques raisons de rechercher dans quelques protéines l'origine de ce pigment.* »

Cette conception semble être celle des auteurs actuels et on peut résumer la théorie moderne de l'origine du pigment normal en faisant de lui un dérivé des matières protéiques.

Nous avons vu, en effet, que par sa constitution, par ses propriétés, par ses produits de décomposition, l'urochrome semble n'avoir aucun rapport d'origine avec l'urobiline comme le pensent RIVA [87], CHIODERA [14], KLEMPERER [48], GARROD [29] et ses collaborateurs. Il ne dérive, semble-t-il, pas de l'hématine, de l'hémoglobine et ne peut être classé dans les couleurs hématiques caractérisées par le noyau hémopyrrolique. L'absence de fer dans la molécule, la présence de soufre semblent montrer que ce corps ne dérive pas de la partie colorée de l'hémoglobine.

Il semble maintenant admis qu'il n'y a pas similitude d'origine dans les matières colorantes de la bile, du sang et de l'urochrome.

THUDICHUM, déjà en 1868, fait de ce pigment un corps différent de l'urobiline et de l'hématine.

Les travaux d'UDRANSKY [105], de PLOSZ [84], d'HOPPE-SEYLER [43], de SALKOWSKI [90], de BINET [4], confirment la diversité d'origine de ces pigments. On ne saurait énumérer la multitude de travaux faits à ce sujet et les nombreuses opinions établies sur la genèse du pigment normal. La tendance moderne est de chercher l'origine dans les matières protéiques. Cette nouvelle conception semble, d'après l'avis même de DOMBROWSKI, changer complètement les idées qu'on s'était faites sur la nature chimique, sur l'origine, sur le mécanisme de sa formation.

Cette conception est l'idée directrice d'un grand nombre de travaux modernes de DOMBROWSKI NENCKI, VERNE, MOREL [69], PELKAN [82], MAILLARD [64], WEISZ, GUT, etc., et elle est confirmée par les connaissances actuelles du pigment urinaire.

Outre la constitution d'acide azoté et sulfuré voisin des **acides oxyprotéiques**, la présence du noyau pyrrolique, le pigment mélanique qui en dérive, la réaction d'EHRICH qui est donnée par l'urochrome, la variation quantitative de ce pigment en rapport avec l'alimentation, l'état pathologique du sujet vient apporter une preuve des plus importantes pour la théorie de l'origine albuminoïde de l'urochrome.

L'étude de la variation de ce pigment normal peut servir à mesurer « l'oxydation plus ou moins complète des matières protéiques de l'organisme ».

Il est difficile, en l'état actuel des connaissances, de suivre la formation des matières colorantes en partant de la protéine cellulaire et de montrer la dégradation successive de la molécule complexe qu'est une albumine

jusqu'au stade de la matière colorante à l'état de chromogène ou de pigment tout formé. Mais quoique le problème semble encore loin d'être résolu, il semble d'après cette étude qu'il est naturel de faire de l'urochrome un pigment d'origine protéique, et DOMBROWSKI résume ainsi la question quand il écrit :

« Le seul fait de la présence du soufre dans l'urochrome démontre que ce corps ne dérive pas de la partie colorée de l'hémoglobine... la composition différente de l'urobiline, la présence du noyau pyrrolique et non hémopyrrolique, le pigment mélanique qui en dérive ainsi que ses variations quantitatives, tout cela témoigne de l'origine albuminoïde de l'urochrome. »

CONCLUSIONS

1° D'après une étude historique des pigments urinaux, il nous semble possible d'attribuer la couleur de l'urine à un pigment : *l'urochrome*.

2° La méthode d'extraction décrite par A. FLORENCE, que nous avons employée, semble sélective et nous a permis d'obtenir une matière colorante à propriétés caractéristiques.

3° La matière extractive obtenue par cette méthode a les caractères physiques, chimiques de l'urochrome des auteurs, en particulier de DOMBROWSKI. L'action des dissolvants, des acides, des bases des réactifs de coloration et de précipitation est identique sur notre matière colorante et sur l'urochrome.

4° L'urochrome de DOMBROWSKI, comme celui de notre méthode, ne donnent ni en solution acide, ni en solution alcaline, de bande d'absorption, mais une bande diffuse dans la région violette du spectre.

5° Le pigment urinaire normal, l'urochrome, a une composition élémentaire très voisine de celle du pigment étudié : ce sont des acides azotés et sulfurés.

6° L'identification de notre matière colorante et de l'urochrome peut être faite, semble-t-il, puisqu'ils don-

nent l'un et l'autre la diazoréaction d'Ehrlich, par distillation un pyrrol, par des agents physico-chimiques des mélanines identiques.

7° La méthode de A. FLORENCE semble nous donner l'urochrome, pigment normal de l'urine dérivé des matières protéiques.

Le Président de la Thèse,

D^r G. FLORENCE.

VU :

Le Doyen,

JEAN LÉPINE.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 3 novembre 1931.

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARRAL (E.). — Précis d'analyse chimique biologique clinique. L'urine, p. 131. Paris, Baillière, 1929.
BARRAL (E.). — Précis d'analyse chimique quantitative, t. II, p. 228. Paris, Baillière, 1927.
- [2] BEAUME. — Essai d'étude spectrale de l'urine dans divers états pathologiques. *Thèse de médecine*, p. 33 à 35. Paris, Parent, 1879.
- [3] BERZÉLIUS (B.). — *Lehrb. d. Chem.*, 4 Auflage, t. IX, p. 553.
- [4] BINET (P.). — *Revue Méd. Suisse*, 1894, t. XIV, p. 44, cit. *Malys Jahr. d. Tierchem*, 1894, t. XXIV, p. 289.
- [5] BOCCHI (O.). — *Beit. z. Chem. Phys. u. Pathol.*, 1907, t. II, p. 79.
- [6] BOCCHI (O.) et GHELFI (A.). — *Jahresb. f. Tierchem*, 1908, t. XXXVIII, p. 815.
- [7] BOGOMOLOFF (Th.). — *Petersbrüger Med. Woschen*, 1892, cit. *Malys Jahr. d. Tierchem*, 1892, t. XXII, p. 536.
- [8] BONDZYNSKI (St.), DOMBROWSKI (St.) et PANECK (K.). — Ueber die Gruppe von Stickstoff u. Schwefelhaltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn luthalten sind. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1905, t. XLVI, p. 83-124. *Bull. d. Ac. Scienc. d. Crac.*, 1905, série B, p. 429.
- [9] BONDZYNSKI (St.) et GOTTLIEB. — « Ueber einen bisher unbekannten Harnbestandteil, die Oxyproteinsäure ». *Zentr. f. d. Med. Wiss.*, J. 1897, Nr. 33.
- [10] BONDZYNSKI (St.) et PANECK (K.). — « Ueber Allosuy proteinsäure, einen normalen Harnbestandteil ». *Bull. de l'Acad. d. Scienc. de Cracovie*, octobre 1902; *Berl. d. Deuts. Chem. Ges.*, 1902, t. XXXV, p. 2959.

- [11] BROWINSKI (J.) et DOMBROWSKI (St.). — *Journ. d. Phys. et Path. Gén.*, 1908, p. 819-824 ; *Bull. de l'Ac. Scienc. d. Crac.*, 1908, t. VIII, p. 155, cité par *Malys. Jahrb. d. Tierchem.*, 1908, t. XXXVIII, p. 353.
- [12] CAUTIN. — *Journ. de Chim. Méd.*, t. IX, p. 104.
- [13] CHIHENDERS et ALBRO. — *Americ. J. Phys.*, t. II.
- [14] CHIODERA (D^r P.). — Contributo allo studia della genesidel pigmento giallo fondamentale dell'urina. *Arch. Ital. diclinica Med.*, 1896, t. XXXV, p. 505 ; *Jour. de Phys.*, t. XI, p. 190.
- [15] CORDIER, cité par GAUTRELET dans *Rev. Mal. Nut.*, 1897, p. 49 et dans thèse sur la spectroscopie clinique des pigments, 1900, p. 61.
- [16] COTTON. — « L'urocyanine nouvelle matière colorante de l'urine ». *Bull. de Phar. de Lyon*, juillet-août 1898.
- [17] CREMER (M.). — *Zeit. f. Biol.*, 1898, t. XXXVI, p. 124.
- [18] DENIGÉS. — Dosage de l'urobiline. *Soc. Biol.*, 20 mars 1897.
- [19] DISQUÉ. — Uber Urobiline. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1877, p. 259.
- [20] DISQUÉ et ROSIN. — *Zeit. f. Physiol. Chem.*, 1896, t. II, p. 264.
- [21] DOMBROWSKI (S.). — Etude de la nature chimique de la matière colorante fondamentale des urines. *Bull. de l'Acad. des Scienc. de Cracovie*, octobre 1907, p. 777 à 836 ; *Compte rendu de l'Acad. des Scienc.*, 1907, t. CXLV, p. 575-577 ; *J. P. C.*, 1907, t. XXVII, p. 507.
- [22] DOMBROWSKI (St.) — Uber die Chemische Natur des spezifischen Farbstoffs des Harus. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1908, t. LV, p. 188-238, p. 390-397, cité *Bull. de S. Chim. de Paris*, 1908, t. II, p. 1354 et 1456 ; *B. S. P.*, 1908, p. 1354-1356 ; *Bull. Acad. Sc. Cracovie*, 1908, p. 139 ; *J. P. C.*, 1908, t. XXVIII, p. 226.
- [23] DOMBROWSKI (St.). — Uber das Uromélanin das Abbanprodukts des Harnfarbstoff, 1909, t. LXII, p. 858-860. *Journ. d. Phys. et Pathol. Gén.*, 1909, p. 819-824 ; *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1912, t. LXXVII, p. 92-106 ; *Bull. Acad. Sc. Cracovie*, 1914, p. 256 ; *J. P. C.*, 1923, p. 140.
- [24] DRAKLIN (D.-L.). — *J. Biol. Chem.*, 1926, t. XL, p. 67 ; *J. of Biol. Chem.*, 1927, t. LXXV, p. 443-487.

- [25] EISELT. — Prager Vierteljahrshüft f. d. pactische Heil-
kunde, 1857, t. LXXVI, p. 47.
- [26] FISCHER (O.) et HEPP. — *Berl. d. Chem. Ges.*, t. XIX,
p. 225.
- [27] FLORENCE (A.). — Dosage des pigments hémaphéiques.
J. P. C., 1910, t. II, p. 161.
- [28] FOURCROY et VAUQUELIN. — *An. d. Chem.*, 1798, t. XXXI,
p. 68.
- [29] GARROD (A.-E.). — *J. of Phys.*, 1892, t. XIII, p. 598 ;
1893, t. XV, p. 108 ; *Proceeding of th. Roy. Soc.*,
1894, t. LV, p. 394 ; *J. of Phys.*, 1895, t. XVII,
p. 335 ; 1896, t. XX, p. 120 ; 1897, t. XXI, p. 190-191 ;
1903, t. XXIX, p. 337.
- [30] GAUTHIER (A.). — Leçons de chimie biologique normale
et pathologique, p. 621. Paris, Masson, 1897.
- [31] GAUTRELET (E.). — Technologie de l'urobiline. *Rev.*
mal. nutr. ; Dosage et séméiologie de l'uroerythrine,
1896, p. 293 ; Essai de spectroscopie urologique.
Rev. mal. nutr., 1897, p. 859.
- Spectroscopie critique des pigments urinaires nor-
maux. *Thèse de pharmacie*. Paris, Berthier, 1900.
- [32] GÉRARD (E.). — *Traité des urines*, p. 7. Paris, Vigot,
1907.
- [33] GUBLER. — *Société Biol.*, 1851.
- [34] GUR (H.). — Contribution à l'étude de la diazoréaction
d'Erhlich. *Thèse de pharmacie*. Paris, 1923.
- [35] HARLEY (G.). — *Journ. f. prakt. Chem.*, 1857, t. XIV,
p. 164 ; The urine and its derangements. Philadel-
phie, 1872 ; De l'urine et de ses altérations pathologi-
ques, p. 120-297. Paris, 1875.
- [36] HARLEY (Vh.). — *Brit. med. Journ.*, 1896, p. 11. (Tirage
à part).
- [37] HASSAL. — *Phil. transat.*, 1864, p. 297.
- [38] HELLER (H.). — *Arch. d. Phys.*, 1854 (2), t. III, p. 113.
- [39] HÉNOCQUE (H.). — Spectroscopie du sang et des pig-
ments. *Encyclopédie des Aides-Mémoires*, 1898,
t. III, p. 14-19, 129. Paris, Masson.
- [40] HOLWEG (H.). — Erste Mittelung zut Kentris des uro-
chroms. *Bioch. Zeit.*, 1908, t. XII, p. 199-205 ; *B. S.*
C. P., 1909, p. 842.

- [41] HOPKINS et GARROD (A.-E.). — *Jour. of Phys.*, 1895, t. XXII, p. 462.
- [42] HOPKINS et COLE. — *Jour. of Phys.*, t. XXIX, p. 451.
- [43] HOPPE-SEYLER (F.). — *Handhrich der Physiologische and Pathologische Chemische analyse*. Berlin, 1870-1879; *Virchows Archiv.*, 1891, p. 124; *Zeit. f. Phys. Chem.*, t. XIII, p. 66; *Chem. Analyse*, 1903, p. 291.
- [44] HUGOUNENQ (L.). — *Précis de Chimie physiol. et path.* Paris, Doin, 1897, p. 168; 1921, p. 663.
- [45] JAGER (L. de). — *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1910, t. LXIV, p. 110.
- [46] JAFFÉ (M.). — *Centr. f. d. Med. Wiss.*, 1868, p. 243; 1869, p. 177; *Arch. Gén. de Med.*, 1873, t. XXV, p. 100; *Beir. d. Deut. Chem. Gesel.*, 1901, t. XXIV, p. 27.
- [47] JULIA. — *Arch. Gén. de Méd.*, t. II, p. 104.
- [48] KLEMPERER (G.). — *Berl. Klin. Woschen.*, 1903, p. 313; *Münch. Med. Wosch.*, 1903, p. 269.
- [49] KRAMM (W.). — *Über ein neuer Lösungsmittel der Harnfarbstoff*. *Deut. Med. Wosch.*, 1896, t. II et III, p. 25 et 42.
- [50] KURAJEW. — *Zeit. Phys. Chem.*, t. XXVI, p. 501.
- [51] LAMBLING (E.). — *Bull. Société Chim. Paris*, p. 1354; *Précis de Biochimie*, p. 466. Paris, Masson, 1921.
- [52] LANCET (R.). — *Bradshaw Lecture*, 1900, t. II, p. 1330.
- [53] LEFÈVRE. — *Relation entre quelques pigments de l'urine, de la bile et du sang*. *Thèse médicale*. Bordeaux, Gounouilhon, 1898.
- [54] LEHMANN (J.-C.). — *Journ. f. prakt. Chem.*, 1842, t. XXV, p. 1.
- [55] LEWIN (L.), MIETH (A), STENGER (E.). — *Arch. f. d. Ges. Phys.*, 1907, t. CXVIII, p. 80.
- [56] LIEBERMANN (H.). — *Über die Gruppe von Stihstoff und Schwefelhaltigen organischen Säuren welche im normalen Menschen Harn enthalten sind*. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1907, t. LII, p. 129-145.
- [57] LIEBIG (J.). — *Ann. d. Ch., u. Phys.*, 1844, u. L, p. 168-172.
- [58] LIROSSIER. — *Lyon Médical*, 1897, n° 32.

- [59] LIPPICH (F.). — Über die Isolierung reinen Harnstoff aus menschlichen Harn. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1906, t. III, p. 161-179.
- [60] MAC MÜNN. — *The spectroscope in medicine*. Philadelphia, 1880, p. 167-195.
Clinical Chemistry of urine. London, Churchill, 1889.
Journ. of Phys., 1890, t. X, p. 71.
- [61] MAIRET et BOSCH. — *C. R. S. B.*, 1891, t. XLIII, p. 29-94.
- [62] MALY (R.). — Untersuchungen über die Gallenfarbstoffe. *Ann. Chem. u. Pharm.*, 1872, t. CLXI, CLXIII, p. 90; *Journ. of the Chem. Soc.*, 1875, t. XIII, p. 397-401; *Monatsh. f. Chem.*, 1885, t. V, p. 137.
- [63] MANCINI (St.). — Zur Kentruss des Urochromes. *Bioch. Zeit.*, 1908, t. XIII, p. 208-214; *B. S. P.*, 1908, p. 843.
- [64] MAILLARD (L.). — L'indoxyl urinaire et les couleurs qui en dérivent. *Thèse médicale*, Paris, Schleicher, 1903; *Zeit. f. hys. Chem.* t. XXXIX, p. 154; *C. R. S. B.*, t. LV, p. 695.
- [65] MARCET (M.). — *Bibl. Univers. Genève J.*, 1852, p. 144.
- [66] MARCHLEWSKI (L.). — *Zeit. f. Phys. Chem.*, t. XLV, p. 176.
- [67] MARISCHLER (J.). — *Tygodnik lekarski*, 1909, t. IV, p. 457; *Jahr. f. Tierch.*, 1909, t. XXXIX, p. 321.
- [68] MÉHU. — *Archiv. Gén. d. Thérap.*, octobre 1871, novembre 1872; *J. P.*, août 1878, p. 159; *L'Urine*, Paris, Asselin, 1880.
- [69] MOREL (A.). — *Précis de technique chimique*, p. 718. Collection Testut, Paris, Doin, 1909.
- [69 bis] MOREL (A.). et HUGOUNENQ. *Bull. Chim., C. R.*, 4^e s., 1908, t. III.
- [70] MÖRNER (K.-E.). — *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1887, t. XI, p. 133-139; 1899, t. XXVIII, p. 611.
- [71] MELLAMBY et THOMAS (J.). — *J. P. C.*, 1920, p. 420.
- [72] MUELLER. — *J. P. C.*, octobre 1907, juin 1915.
- [73] MULDER. — *Journ. f. prakt. Chem.*, t. XXI, p. 343.
- [74] NENCKI (M.). — *Opera omnia*, t. II, p. 514.
- [75] NENCKI et BERDEZ. — *Opera omnia*, 1855, t. I, p. 806; t. II, p. 87.

- [76] NENCKI et MARCHLENSKI. — *Opera omnia*, t. II, p. 804.
- [77] NENCKI (M.) et ZALESKI (J.). — *Opera omnia*, t. II, p. 797.
- [78] NEUBAUER et HUPPERT. — *Analyse des Harns*, p. 1283 à 1316. Article de Schulz: *Jenae die Farbstoffe des Harns*.
- [79] NEUBAUER et VOGEL. — *Anleitung qualitative und quantitative analyse des Harns*, 8^{me} édition. Wiesbaden, Kreidelsverlag, 1881.
Archiv. für Gemeinschaftlheltn Arbeiten, t. I, p. 137.
- [80] NEUBERG (C.). — *Der Harn*, 1911, t. II, p. 877-954. Berlin, Julius Springer. Article de R.-V. Zeyneck, Prag.
- [81] OLIARI (A.). — Über das Vorhandensein von Chromoscyproteinsäure im Harn der Kinder. *Officine Fresching*, Parma, 1908. *Jahresb. f. Tierch.*, 1908, t. XXXVIII, p. 815.
- [82] PELKAU (K.-F.). — *Journ. of Biol. Chem.*, 1920, t. XLIII, p. 237-242 ; *B. S. P.*, 1921.
- [83] PLIMMER (R.-H.). — *Pratical Phys. Chem.*, 1910, p. 238.
- [84] PLOSZ. — *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1883, t. VIII, p. 83.
- [85] PRATT (Ch.). — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1897, t. XIX, p. 382.
- [86] PROUST (L.). — *Ann. de Chem.*, 1799, t. XXXVI, p. 271; *Ann. de Chem. et Phys.*, 1826, t. XIV, p. 257, 242.
- [87] RIVA DE PARME (A.). — Contributio allo studio della urolritrina. *Archiv. Itali di Clinica Medic.*, 1892-1896, t. XXXV, p. 505 ; *Gaz. Medic. di Torino*, 1896, t. LVII, n° 12.
- [88] RIVA, CHIODERA et KLEMPERER. — *Berlin. Klin. Woch.*, 1903, t. XL, p. 314.
- [89] SAILLET. — *Revue de Médecine*, 1896, p. 543-547.
- [90] SALKOWSKI (E.). — Hoppe Seyler's med. Chemie, 1868. *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1893, t. XIV, p. 484 ; t. XVII, p. 234.
- [91] SALOMONSEN (K.-E.). — Zur Kentniss des Urochromes. *Bioch. Zeit.*, 1908, t. XIII, p. 205-207 ; *B. S. P.*, 1909, p. 842.
- [92] SCHARLING. *Ann. de Ch. u. phys.*, 1842, t. XLII, p. 265.
- [93] SCHERER. *Ann. de Ch. u. phys.*, 1857, t. LVII, p. 180.
- [94] SCHMIEDEBERG. *Arch. path.*, t. XXXIX, p. 65.

- [95] SCHMITT. Essai sur les matières colorantes de l'urine normale. *Thèse médicale*, p. 19-31. Paris, G. Carré et Naud, 1898.
- [96] SCHÜNCK (E.). *Proceeding of the Roy. Socie.*, t. XV, p. 1 ; t. XVI, p. 72, 126-135 ; 1903, t. LXXII, p. 165 ; *Journ. f. prakt. Chem.*, t. XCVII, p. 382 ; *Jahresb. f. Chem.*, 1855, p. 660 ; 1858, p. 465 ; London et Dublin Phil. Mag., 1857, t. XIV, p. 288.
- [97] SCHUTZENBERGER et BOURGEOIS. *Bull. Soc. Chem.*, 1876, p. 289.
- [98] SIMON. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1841, t. XXII, p. 113.
- [99] SORLY. *Proced of the Royal Societ.*, 1867, t. XV, p. 433.
- [100] STOKVIS. *Centralblatt f. d. Med. Wis.*, 1873, p. 14 ; *Maly Jahr. d. Tierchem*, 1891, p. 186.
- [101] STUDENSKY. Zur Prage der quantitative Bestimmung der urobilin in Harn. Saint-Pétersbourg Wosh, 1893.
- [102] SYDNEY (W.) et COLE (M. A.). *Practical physiol. Chem.*, 1913.
- [103] THUDICHUM (J.). *The Hasting's Prize Essay*, 1853 ; *Chem. News*, 1893, t. LXVIII, p. 275 ; *Brit. Med. Journ.*, 1864, t. II, p. 509 ; *Journ. of prakt. Chem.*, 1868, t. CIV, p. 257 ; *Journ. of the Chem. Soc.*, 1875, t. XIII, p. 396-401 ; *C. R. A. S.*, 1888, t. CVI, p. 1803-1903, p. 106.
- [104] TICHBORNE. *Chem. News*, 1862, t. V, p. 163.
- [105] UDRANSKY (L.-V.). *Zeit. f. Phys. Chem.*, 1887, p. 537 ; 1888, t. XII, p. 33-42.
- [106] VAUQUELIN. *Ann. du Mus. d'Hist. Natur.*, 1811, t. XVII, p. 433.
- [107] VERNE. *Couleurs et pigments des êtres vivants*. Paris, Colin, 1930, p. 1891.
- [108] VIGLEZIO. Sulla patogenesi dell. urobilinuria in to esperimentale, 15 septembre 1891.
- [109] VIERODT. Die Anwendung des spectralapparates, 1873. Tübingen, p. 134 ; Die quantitative spektral analyse, 1876. Tübingen, p. 78 ; *Zeit. f. Biol.*, 1874, t. XXI, p. 10.
- [110] VILLEJEAN. *Pigments et matières colorantes de l'économie animale. Thèse d'agrégation*, 1886, p. 57.

- [111] WEISZ (M.). *Bioch. Zeit.*, 1911, t. XXX, p. 333-356 ; 1917, t. LVIII, p. 342-354 ; 1920, t. CXII, p. 62 ; 1922, t. CXXXIII, p. 331-349 ; 1923, t. CXXXIV, p. 567-588 ; *B. S. P.*, 1922, p. 754 ; 1924, p. 876.
- [112] WÜRTZ (A.). Dictionnaire de chimie pure et appliquée, 1878, t. III, p. 585. Paris, Hachette ; p. 961, t. VII, 2^{me} supplément.
- [113] WÜRTZER (cité par BERZÉLIUS. *Lehrb. d. Chem.*, 1840, t. VII, p. 357 et 443.
- [114] YVON (P.) et MICHEL (Ch.). Manuel d'analyse des urines et de séméiologie urinaire, 1920. Paris, Doñ, p. 67.
- [115] ZAWARDSKI. *Arch. f. path. med. et pharm.*, p. 450.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13
PLAN SUIVI DANS CE TRAVAIL.....	15
CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude théorique des pigments urinaires :</i>	
A. — Couleur de l'urine.....	17
B. — Historique	22
C. — Méthode	32
CHAPITRE II. — <i>Recherches personnelles sur le pigment urinaire obtenu par la méthode extractive de A. Florence :</i>	
A. — Méthode d'extraction.....	45
B. — Propriétés physiques et réactions de la substance extractive colorante.....	54
C. — Etude spectrale de l'urine et en particulier de l'urochrome étudié.....	62
CHAPITRE III. — <i>Composition chimique de la matière colorante :</i>	
A. — Propriétés chimiques.....	71
B. — Analyse élémentaire.....	75
CHAPITRE IV. — <i>Théorie sur la constitution probable du pigment normal urinaire :</i>	
A. — C'est un corps voisin des acides oxyprotéiques	85
B. — La réaction d'Erlich et l'urochrome....	89
C. — Etude du pyrrol donné par l'urochrome.	92
D. — Mélanines données par l'urochrome....	95
CHAPITRE V. — <i>Résumé. — Conclusions :</i>	
A. — Similitude du pigment de A. Florence avec l'urochrome.....	99
B. — Variations de la quantité d'urochrome éliminé	101
C. — Origine probable de l'urochrome.....	104
CONCLUSIONS	107
BIBLIOGRAPHIE	109

